

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Identificación de reductasas de ácidos hidroxicinámicos y sus
derivados en *Lactobacillus plantarum* WCFS1**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Santamaría Rubio

Directores

**Rosario Muñoz Moreno
Blanca de las Rivas González del Rey
Félix López de Felipe Toledano**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**Identificación de reductasas de ácidos
hidroxicinámicos y sus derivados en
Lactobacillus plantarum WCFS1**

Memoria presentada por:

LAURA SANTAMARÍA RUBIO

para optar al grado de **doctor**

DIRECTORES:

Rosario Muñoz Moreno

Blanca de las Rivas González del Rey

Félix López de Felipe Toledano

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Madrid, 2017

Dña. ROSARIO MUÑOZ MORENO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC, Dña. BLANCA DE LAS RIVAS GONZÁLEZ DEL REY, CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC, Y D. FÉLIX LÓPEZ DE FELIPE TOLEDANO, CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC,

CERTIFICAN:

Que la memoria del trabajo de investigación titulada: **“Identificación de reductasas de ácidos hidroxicinámicos y sus derivados en *Lactobacillus plantarum* WCFS1”** que presenta **Dña. Laura Santamaría Rubio**, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Procesos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del CSIC, bajo nuestra dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en

Madrid a 7 de Abril de 2017.

Directores de la Tesis

Dra. Rosario Muñoz Moreno

Dra. Blanca de las Rivas
González del Rey

Dr. Félix López de Felipe
Toledano

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias a la beca BES-2012-053470, perteneciente al subprograma de Formación de Personal Investigador (FPI), concedida por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Y también por la dirección del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición que me permitió utilizar sus instalaciones para su realización.

Bueno, y ahora a los que no pusieron pelas (sino algo más valioso).

Una hoja en blanco para poner lo que yo quiera, qué peligro. En fin, habrá que hacerlo con un poco de método porque si no esto puede acabar igual que aquel anuncio de la Coca-cola para todos (Coca-cola et al., 2007).

Lo primero es lo primero. Muchas, pero que muchas gracias Rosario y Blanca por admitirme en vuestro proyecto porque esta oportunidad me ha cambiado la vida. Gracias por toda vuestra paciencia (por no tirarme por la ventana), los buenos consejos, por estar siempre pendientes y por todo lo que he aprendido (que no es poco). Pondría más pero no es cuestión que esto ocupe más que los Resultados ;). Muchas gracias Félix por hacerte cargo de la tesis y tu supervisión, a pesar de lo complejo de la distancia (de metro a metro, pero ya tiene su aquel). A Josemi, muchísimas gracias por tu ayuda, por estar siempre disponible y poner algo de química al asunto.

A mis compañeros de laboratorio empezando por Lauryn (también conocida como Laura P), este año sin ti no hubiera sido posible. Tanto en lo profesional como en lo personal has estado increíble y te lo agradeceré toda la vida. A Mary, tu ayuda en el laboratorio fue crucial y fuera, más inclusive. Gracias por hacer de mi estancia una experiencia fantástica. A Inés, por recordarme que soy una persona ordenada. A mi Pequeño Saltamontes, por hacerme ver que sé más de lo que aparento. A Silvia, por todos sus ánimos en una mala época. A Sandra, por “reducir” un poco conmigo. A María (la de “Güerva”) y a Aida, por las sonrisas

mañaneras y el buen humor en el labo. A Natalia, por todo lo que me enseñaste y tu cariñosa paciencia. A Iván y Rocío, por vuestras animadas visitas. Supongo que se me pasa un montón de gente, así que a todos aquellos que habéis pasado por el labo, aunque sea sólo por un instante, os lleváis un saludo. Y a Pepe, dejo lo mejor para el final, aunque seas del Madrid. Gracias por compartir tus conocimientos (que sí, que son muchos), por echar siempre una mano y por los buenos momentos.

Ahora la segunda parte. Todos aquellos que han aguantado la tesis desde fuera. A mis padres, que supisteis desde el principio que lo mío era cosa de Biología y probetas, culpa vuestra por grabarme “Erase una vez el cuerpo humano” (Barillé *et al.*, 1987). Vuestro apoyo y la fe en mí que habéis demostrado no me la ha dado nadie, deberíais estar nombrados incluso antes que la beca del Ministerio. De mil amores, gracias. A mi peque (mi hermana) que siempre tratas de hacer el esfuerzo para recordar de qué narices va mi tesis. Has sido una gran cómplice, con besos cuando hacían falta y las collejas cuando se requerían. No te lo digo mucho pero tú y yo lo sabemos (guiño, guiño). A Edu, tal vez los genes digan lo contrario, pero no he podido tener mejor hermano mayor que tú. Todos estos años me has regalado tu apoyo en momentos malos, me has aguantado lo que no está escrito y además me has dado muy buenos consejos tanto en lo profesional como en lo personal, tú y Lauryn sois impagables. A mi yayi, y yo que pensaba que estarías en la defensa de la tesis. Con lo que iba a presumir yo de abuela. Ya te imaginaba sentada, lo más cerca que pudieses de la tarima, afinando al máximo la vista y el sonotone, para poder enterarte de las cosas “tan increíbles” que hace tu antigua compañerita de piso. Aunque para esto no tengo referencia bibliográfica ni experimentos que lo prueben, sé que vas a estar allí. Te pondrás tus más coquetas galas celestiales y vendrás bien cogida del brazo del “Poeta”, presumiendo de lo inteligente y guapa que es tu nieta. A Freya, por tu minina compañía mientras escribía y tus ronroneos mañaneros. Y al “Hombre del sofá”, que si no se pica.

Ahora toca un poco de popurrí, que si no esto no se acaba. Un recuerdo especial a mis compis de idas de pinza: Dita, Rosa, Raquel, Esther y Elena "líquenes". A Erica, por tus ánimos constantes desde León. A Raúl por su ayuda y a Daniele, Jenny e Irene, por hacerme sentir como en casa. A mi cuñado, por tener siempre una sonrisa para mí. A Rober, por aparecer en el momento oportuno. A Sergio, por hacerme estrujar el cerebro y recordar Biología básica. A mi compañero de las once, por compartir tanta charla científica. A Berti, por tu granito de arena. Un saludo especial para mis antiguos compis: Ginés, Susana y Gliselle; y a Lolo por abrirme las puertas. Una mención con mucho cariño tanto a los Santamaría (Marisa incluida, obviamente) como a los Rubio (no os nombro a todos que sois muchos), por las veces que me dijisteis « ¡ánimo!» Y a mis tíos Pepa y Alberto, por demostrarme que el cariño va más allá de la sangre. "Puck", "Loki" y "Long Bob", ha sido arduo, ha sido duro, pero creo que por fin vamos llegando a acuerdos. Gracias por compartir algunos de vuestros secretos.

A todos aquellos que os alegrasteis de mis comienzos, pero que no habéis podido ver el final. Os llevo conmigo.

Perdón por adelantado si me dejo a alguien, no tengo últimamente neuronas para tanto nombre.

Sólo un par de cositas más. He de hablar de cierto caballero, Don Alberto Santamaría del Río, amante de la radio y fiel colchonero. Tu presencia me ha acompañado a lo largo de toda la tesis y varias veces he imaginado que dirías al ver a tu «nieta, la mayor» con la bata blanca. Todavía quedan trazos de tu espíritu en todo el edificio y no puedo evitar sonreír cada vez que bajo las escaleras y veo por la ventana tu albaricoquero. Estés donde estés, el día de la presentación te espero.

En cualquier publicación científica, ya se sabe, los más importantes van al principio y al final. Está claro a quien tengo que nombrar. Si no fuera por

ti, M^a Victoria, esto no sería posible. Me gustaría decir mucho, tanto en lo personal como en lo profesional, pero sería inútil, serían páginas y páginas que realmente no reflejarían ni la mitad del valor de todo lo que has hecho por mí. Yo ahora estoy aquí a punto de obtener mi doctorado por ti y sólo por ti. Necesitaré de varias vidas para poder agradecértelo. De todo corazón, gracias.

Por dar un gracias

Se gana en méritos

Más que por glorias

(Haiku)

Laura S. R. 2017

“Para los que siempre han
caminado a mi lado”

«El científico no tiene por objeto un
resultado inmediato. Él no espera que sus
ideas avanzadas sean fácilmente
aceptadas. Su deber es sentar las bases
para aquellos que están por venir y señalar
el camino»

Nikola Tesla

«How you turn my world, you precious thing

You starve and near exhaust me

Everything I've done, I've done for you

I move the stars for no one (...)

Though, I do believe in you.

Yes, I do»

"Within you". David Bowie (1986)

ÍNDICE

Resumen.....	I	
Summary	III	
Lista de abreviaturas	V	
I. INTRODUCCIÓN		
1. Compuestos fenólicos	1	
1.1. Clasificación.....	2	
1.2. Ácidos hidroxicinámicos.....	4	
1.2.1. Propiedades sensoriales y saludables de los alimentos asociadas a los ácidos hidroxicinámicos.....	5	
2. Bacterias lácticas en alimentos.....	6	
2.1 Metabolismo de compuestos fenólicos en bacterias lácticas.....	6	
2.1.1. Metabolismo de ácidos hidroxicinámicos en bacterias lácticas	8	
2.2 Metabolismo de compuestos fenólicos en <i>Lactobacillus plantarum</i>	10	
3. Reductasas de ácidos hidroxicinámicos	13	
II. OBJETIVOS.....		19
III. MATERIAL Y MÉTODOS		
1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	23	
2. Medios y condiciones de cultivo.....	26	
3. Técnicas de ADN	27	
3.1. Extracción de ADN cromosómico	27	
3.2. Extracción de ADN plasmídico	27	
3.2.1 Extracción rápida	27	
3.2.2 Extracción de alta pureza	28	
3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR	28	
3.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	29	
3.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	30	
3.6. Método de clonación.....	30	
3.6.1. Método de clonación independiente de ligación (LIC).....	30	
3.6.2. Método de clonación con enzimas de restricción	31	
3.7. Secuenciación de ADN y análisis de la información	32	

4. Transformación genética de cepas bacterianas	33
4.1. Transformación genética en <i>Escherichia coli</i>	33
4.2. Transformación genética en <i>Lactobacillus plantarum</i>	34
4.2.1 Interrupción genética en <i>Lactobacillus plantarum</i>	35
5. Técnicas de ARN	36
5.1. Extracción de ARN	36
5.2. Validación de las muestras de ARN	37
5.3. Tratamiento del ARN con DNasa	37
5.4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real	38
5.4.1. Síntesis del ADNc mediante la enzima transcriptasa inversa	38
5.4.2. Diseño de oligonucleótidos para el análisis mediante RT-qPCR	38
5.4.3. Ensayo de RT-qPCR	38
6. Técnicas de proteínas	40
6.1. Preparación de extractos proteicos.....	40
6.2. Hiperproducción y purificación de enzimas recombinantes	41
6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida	42
6.4. Identificación de proteínas mediante huella peptídica y fragmentación MALDI TOF/TOF	43
6.5. Ensayos de actividad enzimática	44
6.5.1. Ensayos con extractos de <i>Escherichia coli</i>	44
6.5.2. Ensayos con proteínas puras	44
6.5.3. Ensayos en cultivos de bacterias lácticas	45
6.6. Análisis de actividad enzimática mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	45

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Metabolismo de ácidos hidroxicinámicos	49
1. 1. Identificación de la proteína reductasa de ácidos hidroxicinámicos en <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	52
1.1.1. Organización genética de la región adyacente a los genes <i>lp_1424</i> y <i>lp_1425</i> en <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1.....	57
1.1.2. Análisis transcripcional de la región adyacente a los genes <i>lp_1424</i> y <i>lp_1425</i> en <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1.....	58
1.1.3. Implicación de los genes adyacentes a <i>lp_1424</i> y <i>lp_1425</i> en la reducción de ácidos hidroxicinámicos.....	61
1.1.4. Estudio de la expresión de los genes <i>lp_1424</i> y <i>lp_1425</i> en presencia de ácido <i>m</i> -cumárico	65

1.1.5. Clonación del gen y producción de la proteína Lp_1425	68
1.1.6. Actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos en la proteína Lp_1425.....	72
1.1.7. Producción de la proteína Lp_1424 y estudio de su actividad reductasa.....	81
1.2. Identificación de sustratos de la reductasa Lp_1425	90
1.3. Inducción de la actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos.....	93
1.4. Actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos en otras bacterias lácticas	95
2. Metabolismo de vinil fenoles	108
2.1. Identificación de la proteína reductasa de vinil fenoles	
en <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	108
2.1.1. Organización genética de la región adyacente al gen <i>lp_3125</i>	
en <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1.....	109
2.1.2. Análisis transcripcional de la región adyacente al gen <i>lp_3125</i>	
en <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1.....	110
2.1.3. Implicación de los genes adyacentes a <i>lp_3125</i> en la reducción	
de vinil fenoles	113
2.1.4. Clonación del gen y producción de la proteína Lp_3125	117
2.1.5. Actividad reductasa de 4-vinilfenol en la proteína Lp_3125.....	123
2.2. Identificación de sustratos de la reductasa Lp_3125.....	125
2.3. Inducción de la actividad reductasa de vinil fenoles.....	128
2.4. Actividad reductasa de vinil fenoles en otras bacterias lácticas	130
 V. CONCLUSIONS	 141
 VI. BIBLIOGRAFÍA	 145

Resumen

Los ácidos fenólicos constituyen aproximadamente un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta y están asociados con propiedades organolépticas, nutricionales y antioxidantes de los alimentos. El término “ácido fenólico” incluye compuestos que poseen al menos un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico como grupo funcional. Los ácidos fenólicos presentes en la naturaleza se pueden dividir en dos grupos en función de su estructura: los ácidos hidroxicinámicos y los ácidos hidroxibenzoicos, siendo más comunes los primeros. Los ácidos hidroxicinámicos incluyen fundamentalmente a los ácidos *p*-cumarico, cafeico, ferúlico y sinápico.

Lactobacillus plantarum es la especie de bacteria láctica que más frecuentemente se aísla de fermentaciones de alimentos de origen vegetal en los que los ácidos hidroxicinámicos son abundantes. En *L. plantarum*, el metabolismo de estos ácidos puede seguir dos rutas diferentes. Por un lado, los ácidos hidroxicinámicos pueden reducirse directamente a sus correspondientes ácidos fenilpropiónicos sustituidos mediante la acción de una reductasa; la otra ruta implica la acción secuencial de dos enzimas, en primer lugar una descarboxilasa que descarboxila el ácido a su vinil derivado y posteriormente una reductasa que lo reduce a su correspondiente etil derivado. De todas las enzimas implicadas en la transformación de ácidos hidroxicinámicos en *L. plantarum*, hasta el momento actual, tan solo se ha descrito a nivel genético y molecular la descarboxilasa Lp_3665, mientras que las reductasas implicadas en ambas rutas se desconocen tanto a nivel enzimático como genético.

El estudio transcriptómico global de la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 a la presencia de un ácido hidroxicinámico (ácido *p*-cumárico) reveló que tres genes que codificaban posibles reductasas mostraban una inducción de su expresión (*lp_1424*, *lp_1425* y *lp_3125*). La interrupción de estos genes en *L. plantarum* WCFS1, mediante un proceso de inserción duplicación por recombinación homóloga, demostró que los mutantes en los que se habían interrumpido los genes *lp_1424* y *lp_1425* no fueron capaces de reducir los ácidos hidroxicinámicos mientras que el mutante del gen *lp_3125* no redujo los vinil a etil fenoles.

Mediante transcripción reversa se demostró que los genes *lp_1424* y *lp_1425* se transcriben juntos. El análisis de expresión génica confirma que en la reducción de los ácidos hidroxicinámicos es necesaria la presencia de una proteína Lp_1425 funcional. Extractos de *Escherichia coli* en los que se hiperexpresó el gen *lp_1425* redujeron los ácidos hidroxicinámicos ensayados. Sin embargo, las reacciones *in vitro* usando la proteína recombinante Lp_1425 hiperproducida y purificada no fueron capaces de reducirlos. Un análisis electroforético de la proteína Lp_1425 reveló que ésta se proteoliza y sólo el dominio carboxilo-terminal de unión a FAD está presente después de purificar y dializar la proteína. Teniendo en cuenta que los genes *lp_1424* y *lp_1425* se expresan juntos en *L. plantarum*, ambos genes se expresaron simultáneamente en *E. coli*. Los resultados obtenidos indicaron que ambas proteínas se purificaban juntas y que la presencia de Lp_1424 evita parcialmente la proteólisis de Lp_1425. En relación a la especificidad de sustrato, se observó que todos los ácidos hidroxicinámicos analizados fueron reducidos por la proteína Lp_1425. Los análisis por HPLC y la detección del gen mediante PCR confirmaron que, de todas las bacterias lácticas ensayadas, solamente aquellas que pertenecían al grupo de *L. plantarum* así como *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus gallinarum* poseían la capacidad de reducir ácidos hidroxicinámicos.

Debido a que la inactivación del gen *lp_3125* impide la reducción de los vinil fenoles a sus correspondientes etil fenoles en *L. plantarum*, este gen se hiperexpresó en *E. coli*. De forma similar a lo que ocurrió con los extractos de *E. coli* cuando se hiperexpresó *lp_1425*, los extractos de *E. coli* con el gen *lp_3125* hiperexpresado fueron capaces de reducir los vinil fenoles ensayados. Por el contrario, en las reacciones *in vitro* utilizando la proteína recombinante Lp_3125 hiperproducida y purificada no se observó dicha reducción. El análisis por HPLC así como la detección del gen mediante PCR revelaron que la capacidad para reducir los vinil fenoles es poco frecuente entre las bacterias lácticas, estando sólo presente en las bacterias del grupo de *L. plantarum*.

Summary

Phenolic acids account for almost one third of the dietary phenols and are associated with organoleptic, nutritional and antioxidant properties of foods. Phenolic acids include phenols that possess one carboxylic acid functional group. The naturally occurring phenolic acids contain two distinguishing constitutive carbon frameworks, the hydroxycinnamic and hydroxybenzoic structures. The hydroxycinnamic acids are more common than are hydroxybenzoic acids and mainly included coumaric, caffeic, ferulic and sinapic acids.

Lactobacillus plantarum is a lactic acid bacterial species that is most frequently encountered in the fermentation of plant materials where hydroxycinnamic acids are abundant. The metabolism of hydroxycinnamic acids on *L. plantarum* has been recently described and could follow two simultaneous pathways. Hydroxycinnamic acids could be directly reduced to their corresponding substituted phenyl propionic acids by a still unknown reductase enzyme. Alternatively, the second pathway implies that hydroxycinnamic acids are decarboxylated into their vinyl phenol derivatives, and then, by an unknown reductase, are subsequently reduced to their corresponding ethyl derivatives. The decarboxylation step is catalyzed by the phenolic acid decarboxylase Lp_3665 enzyme. However, the reductase enzymes involved in the metabolism of hydroxycinnamic acids have not been genetically or biochemically characterized so far.

Whole genome transcriptional analysis of *L. plantarum* WCFS1 in the presence of a hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid) revealed that three genes encoding putative reductases were differentially expressed (*lp_1424*, *lp_1425*, and *lp_3125*). Disruption of these genes in *L. plantarum* WCFS1 by a insertion-duplication mutagenesis, demonstrated that *lp_1424* and *lp_1425* gene mutants were unable to reduce hydroxycinnamic acids whereas the mutant on the *lp_3125* gene was unable to reduce vinyl to ethyl phenols.

Reverse transcription analysis revealed that *lp_1424* and *lp_1425* genes were cotranscribed. Expression analysis confirms that hydroxycinnamic acid reduction implies the presence of a functional Lp_1425 protein. Extracts of *Escherichia coli*

overexpressing the *lp_1425* gene were able to reduce hydroxycinnamic acids. However, reactions *in vitro* using the hiperproduced and purified recombinant Lp_1425 protein were unable to reduce the hydroxycinnamic acid present. Electrophoretic analysis of Lp_1425 protein revealed that it was proteolized and only the C-terminal FAD-binding domain was present on the purified and dialyzed protein. As *lp_1424* and *lp_1425* genes were coexpressed in *L. plantarum*, both genes were simultaneous coexpressed in *E. coli*. The obtained results indicated that both proteins are purified together and the presence of Lp_1424 partially avoids Lp_1425 proteolysis. In relation to substrate specificity, all the hydroxycinnamic acids analyzed were reduced by Lp_1425 protein. HPLC analysis and PCR detection confirmed that, from the lactic acid bacteria assayed, only those belonging to the *L. plantarum* group as well as *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* possessed the ability to reduce hydroxycinnamic acids.

As the inactivation of the *lp_3125* gene avoids the reduction of vinyl to ethyl phenols, this gene was overexpressed in *E. coli*. Similarly to *lp_1425*, extracts of *E. coli* overexpressing the *lp_3125* gene were able to reduce vinyl phenols. Surprisingly, reactions *in vitro* using the hiperproduced and purified recombinant Lp_3125 protein were unable to reduce them. *E. coli* extracts containing recombinant Lp_3125 reduced all the vinyl phenols assayed. HPLC analysis and PCR detection revealed that the capacity to reduce vinyl phenols is scarce on lactic acid bacteria, as it is only present on bacteria from the *L. plantarum* group.

Lista de abreviaturas

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html>), en esta tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

λ	Longitud de onda
2-HPPA	Ácido 3-(2-hidroxifenil) propiónico
3-HPPA	Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico
A	Absorbancia
AC	Ácido cafeico
ACi	Ácido cinámico
AF	Ácido ferúlico
AFlo	Ácido florético
AHC	Ácido hidrocafeico
AHF	Ácido hidroferúlico
AHS	Ácido hidrosinápico
AmC	Ácido <i>m</i> -cumárico
Amp	Ampicilina
AoC	Ácido <i>o</i> -cumárico
ApC	Ácido <i>p</i> -cumárico
AS	Ácido sinápico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
dNTPs	Desoxinucleótidos-5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
DSMZ	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
EC	4-Etilcatecol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	4-Etilfenol
EG	4-Etilguayacol
Em	Eritromicina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GRAS	Reconocido como seguro para la salud (<i>Generally Recognized As Safe</i>)

HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LIC	Clonación independiente de ligación (<i>Ligation independent cloning</i>)
LB	Medio de cultivo de Luria y Bertani
Mb	Megabases
MCS	Sitio de clonaje múltiple (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MRS	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe
mUA	Miliunidad de absorbancia
NADH/NAD ⁺	Nicotín adenín dinucleótido reducido/oxidado
NADPH/NAPD ⁺	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido/oxidado
NCIMB	Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas (<i>National Collection of Industrial and Marine Bacteria</i>)
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
<i>p</i>	<i>p</i> -valor
PAD	Descarboxilasa de ácidos fenólicos (<i>Phenolic acid decarboxylase</i>)
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<i>pI</i>	Punto isoeléctrico
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
PVDF	Polifluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene difluoride</i>)
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real (<i>Real Time quantitative polymerase chain reaction</i>)
R	Resistente
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Cepa tipo
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-NaCl
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad
UV	Ultravioleta
VC	4-Vinilcatecol
VF	4-Vinilfenol
VG	4-Vinilguayacol
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Introducción



1. Compuestos fenólicos

El término “compuesto fenólico” describe a un conjunto heterogéneo de moléculas que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura consiste en uno o varios anillos bencénicos sustituidos por al menos un grupo hidroxilo (Croteau *et al.*, 2000). Constituyen el principal grupo de metabolitos secundarios presentes en el reino vegetal, siendo esenciales para su crecimiento. Entre sus diversas funciones destacan la defensa contra predadores y patógenos, actuar como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas, protección frente a la radiación UV, aportar estabilidad estructural en los tejidos y actuar como aislantes que impermeabilizan las paredes celulares. Por tanto, la mayoría de éstas moléculas son bioactivas, interactúan con el medio ambiente y desempeñan un importante papel de protección contra el estrés abiótico y biótico en las plantas (Croteau *et al.*, 2000).

La estructura química de los compuestos fenólicos es muy diversa, incluyendo desde ácidos fenólicos simples de bajo peso molecular hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular como los taninos condensados y los hidrolizables. La mayoría de estas sustancias y de sus precursores se sintetizan a través de la ruta del ácido siquímico intermediario en la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y de un grupo de metabolitos secundarios conocidos como fenilpropanoides. También pueden obtenerse en menor medida a través de la ruta de síntesis de la malonil-coenzima A (también denominada ruta del ácido malónico); o por ambas rutas como en el caso de los flavonoides (Robbins, 2003; Tohge *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos se localizan principalmente en los frutos, semillas, corteza y órganos aéreos jóvenes de las plantas, por lo que se consumen diariamente en la dieta en cantidades importantes (Harborne y Williams, 2000). Muchos de ellos influyen en las propiedades organolépticas de los alimentos y bebidas que contienen materias primas de origen vegetal determinando en parte la calidad final de los mismos. En la dieta humana las fuentes principales de compuestos fenólicos son las

frutas, verduras y bebidas tales como el té y café. Se ha descrito que estas sustancias participan en la formación del color, modulan el aroma a través de fenoles volátiles que se metabolizan por la microbiota presente de forma natural y confieren amargor, astringencia o acidez. Adicionalmente, sus propiedades antioxidantes son esenciales para la estabilidad de los alimentos y bebidas, así como también en sus efectos en la prevención de ciertas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Kapur y Kapoor, 2001; Dimitrios, 2006).

1.1. Clasificación

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función del número de grupos fenoles que contienen, del número y tipo de grupo funcional que se une al anillo aromático y de los elementos estructurales que unen unos anillos a otros. De esta forma se puede distinguir entre los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides a su vez se dividen en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas) (Manach *et al.*, 2004) (**Figura 1**).

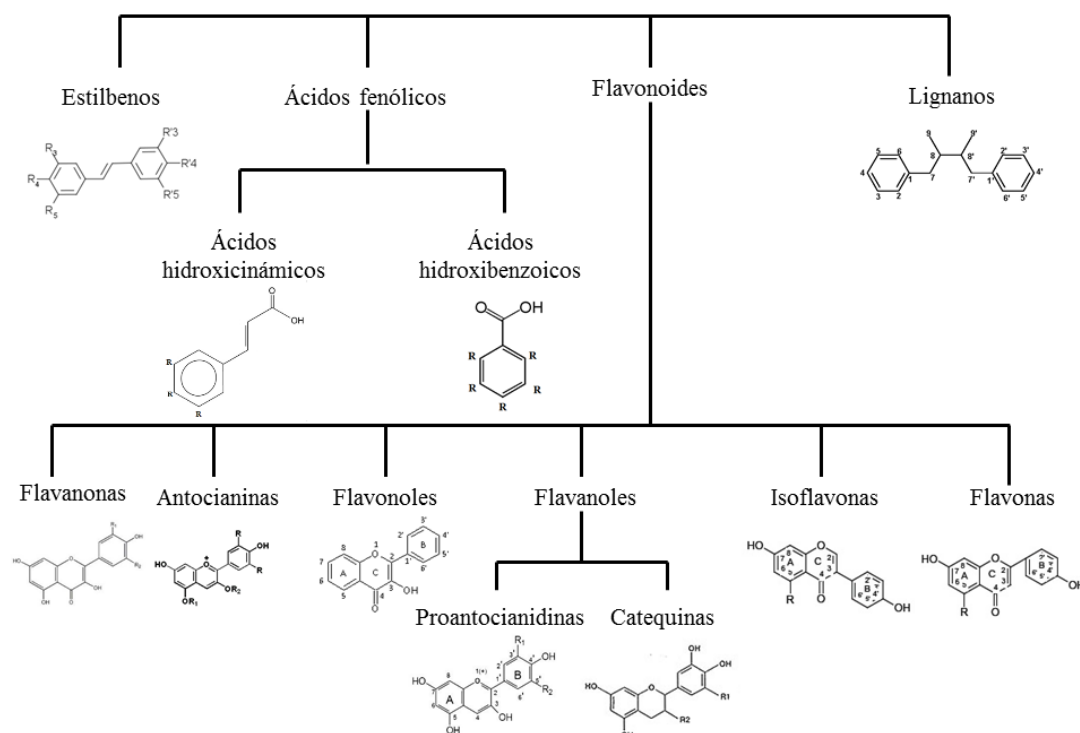


Figura 1. Representación esquemática de la clasificación de compuestos fenólicos basado en Manach *et al.* (2004). Cada grupo muestra su fórmula química general.

Adicionalmente, la diversidad de este grupo se incrementa por la asociación de los compuestos fenólicos con diversos carbohidratos y ácidos orgánicos (Manach *et al.*, 2004)

La presencia de ácidos fenólicos se asocia a propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos y constituyen un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta (Maga, 1978; Vanbeneden *et al.*, 2008). Los ácidos fenólicos poseen un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico como grupo funcional y agrupan a más de 8.000 compuestos sintetizados por plantas que forman parte de la estructura de las paredes celulares vegetales (Lynd *et al.*, 2002; Robbins, 2003). Se pueden dividir en dos grupos principales, los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico (**Figura 2**).

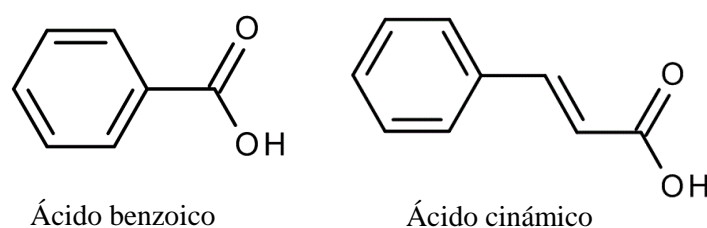


Figura 2. Estructura química de los ácidos benzoico y cinámico

Los derivados del ácido benzoico comparten la estructura C6-C1 del ácido benzoico sobre la que se producen reacciones de hidroxilación y metilación dando lugar a los ácidos gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico, vainillinico, elágico y sirínico, entre otros. Los derivados del ácido hidroxicinámico son los ácidos fenólicos más frecuentes, poseen la estructura C6-C3, e incluyen los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y clorogénico.

1.2. Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos no flavonoides. Su estructura consiste en un anillo bencénico asociado a una cadena de tres carbonos (estructura C6-C3) (Andersen y Markham, 2006)

La síntesis de estos compuestos tiene como origen habitual al aminoácido fenilalanina a través de la ruta del siquimato (El-Seedi *et al.*, 2012). Este aminoácido se metaboliza por la enzima fenilalanina amonio liasa para originar el ácido *trans*-cinámico. A partir de él, a través de una serie de reacciones concatenadas llevadas a cabo por diferentes enzimas con actividad hidrolasa y metiltransferasa se forman los diferentes ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados normalmente se encuentran asociados a otras moléculas formando derivados glicosilados o ésteres del ácido tartárico o de los ácidos quínico y siquímico (Zhao y Moghadasian, 2010). Estos ácidos son difíciles de encontrar en su forma libre en los alimentos vegetales, sin embargo el procesamiento por congelación, altas temperaturas y fermentación, libera los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, entre otros (Manach *et al.*, 2004). El ácido cafeico, libre o esterificado, es el ácido fenólico que se encuentra con mayor frecuencia en las frutas, propóleo (propolis de abejas) y granos de café. Sin embargo, el ácido ferúlico, que se encuentra en hojas y semillas en forma libre o asociado a la lignina, es el compuesto fenólico mayoritario en cereales, describiéndose también en naranjas, tomate y maíz (Maistro *et al.*, 2011). El ácido *p*-cumárico se encuentra en plantas y hongos en su forma libre o conjugada a monosacáridos y polisacáridos, aminas y alcoholes. Este ácido está presente en frutas (uvas, tomates, etc.), vegetales (judías, patatas, etc.) y en cereales (maíz, trigo, etc.). Es más frecuente encontrar el ácido *p*-cumárico en su forma conjugada.

1.2.1. Propiedades sensoriales y saludables de los alimentos asociadas a los ácidos hidroxicinámicos

La presencia de diferentes ácidos hidroxicinámicos en alimentos de origen vegetal influye notablemente en sus propiedades organolépticas. La presencia de sustancias fenólicas volátiles derivadas de estos ácidos influye en el aroma de los alimentos. Algunos ácidos cinámicos, como los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, se descarboxilan por la actividad de ciertos microorganismos y originan derivados vinil fenoles (4-vinilfenol y 4-vinilguayacol) los cuales son compuestos muy aromáticos. Sin embargo, la reducción microbiana de estos vinil fenoles a sus correspondientes etil fenoles derivados (4-etilfenol y 4-etilguayacol) da lugar a aromas que dependiendo del alimento se pueden considerar “*off-flavours*” (desagradables o indeseados) como en el caso de los vinos (Chattonnet, *et al.*, 1995), o aromas característicos como en el caso de las cervezas “*weissenbier*” (cerveza blanca de trigo alemana) y “*Belgian ales*” (cerveza destilada) (Piškur *et al.*, 2012) y de ciertas salsas de origen oriental como la salsa de soja (Yokotsuka, 1986; Shahidi y Naczki, 2004). Con respecto al sabor, a la presencia de ácidos hidroxicinámicos se le atribuye un aumento en la acidez de los alimentos, sin embargo, se ha descrito que el ácido *p*-cumárico en cantidades superiores de 45 mg/Kg puede conferir sensación de amargor y astringencia (Manach *et al.*, 2004).

En relación a sus propiedades nutricionales y saludables, se ha propuesto que el efecto beneficioso o antinutricional de los compuestos fenólicos depende de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad, así como también del grado de transformación que experimenten a su paso por el tracto gastrointestinal o durante su interacción con la microbiota presente en este último. Se ha descrito que los ácidos hidroxicinámicos presentan efectos beneficiosos frente a enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis (El-Seedi *et al.*, 2012; Manach *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha descrito que el ácido *p*-cumárico, especialmente en su forma conjugada, posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antimutagénicas (Pragasam *et al.*, 2013).

2. Bacterias lácticas en alimentos

Las bacterias lácticas representan un grupo heterogéneo de bacterias que responden a la definición de “bacterias en forma de cocos o bacilos, Gram positivas, catalasa negativas, inmóviles, no esporuladas, anaerobias aerotolerantes y que producen ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación de azúcares” (Stiles y Holzapfel, 1997). Este grupo incluye especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y *Oenococcus*, entre otros (Makarova *et al.*, 2006). Las bacterias lácticas se aíslan de hábitats ricos en nutrientes, entre los que se incluyen plantas y animales, por lo que se adaptan a diversos ambientes y presentan una gran versatilidad metabólica. La mayoría de las bacterias lácticas se consideran inocuas y poseen el estatus GRAS para el consumidor (Makarova *et al.*, 2006) siendo responsables de las características organolépticas de algunos alimentos fermentados, por lo que constituyen un grupo bacteriano beneficioso y muy importante para el hombre.

Las bacterias lácticas al encontrarse presentes en una gran variedad de sustratos vegetales y productos agroalimentarios, predominan en las fermentaciones de dichos alimentos. La actividad biológica de las bacterias lácticas permite obtener mejoras en las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos e incrementa su nivel de seguridad y calidad por la inhibición de la microbiota alterante o patógena (Caplice y Fitzgerald, 1999; Rodríguez *et al.*, 2009; Smid y Lacroix, 2012).

2.1 Metabolismo de compuestos fenólicos en bacterias lácticas

Aunque los compuestos fenólicos presentes en las plantas son tóxicos y bacteriostáticos para un gran número de microorganismos, algunas especies de bacterias lácticas se han adaptado a la presencia de estas sustancias y poseen rutas metabólicas para su transformación.

La presencia de bacterias lácticas en sustratos vegetales con un alto contenido de compuestos fenólicos refleja la capacidad que poseen estos microorganismos para transformar estas sustancias. Esta capacidad está relacionada con una respuesta adaptativa al medio ambiente que les confiere ventajas competitivas frente a otros grupos bacterianos. Así, por ejemplo, algunas especies de *Lactobacillus* son intrínsecamente más tolerantes a los ácidos fenólicos cuando se comparan con *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* (Wells *et al.*, 2005; Cueva *et al.*, 2010; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011).

Los estudios relacionados con el metabolismo de los compuestos fenólicos llevado a cabo por las bacterias lácticas son escasos y se han realizado en *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus* y algunas especies de *Lactobacillus*. Whiting y Carr (1957) describieron que durante el proceso de fermentación de la sidra se observaba la desaparición del ácido clorogénico. Empleando extractos celulares de *Lactobacillus paracollinoides* se observó la transformación del ácido clorogénico a ácido cafeico y quínico (Whiting y Carr, 1957). Posteriormente se describió que el ácido caféico formado se transformaba en ácido hidrocaféico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico) y etilcatecol (Whiting y Carr, 1959). Por otro lado, *L. paracollinoides* también fue capaz de reducir la cadena lateral de los ácidos 4-hidroxicinámico y 3,4-dihidroxicinámico y posteriormente descarboxilarlos a etilfenol y etilcatecol. Whiting y Coggins (1971) describieron que en esta especie una reacción de reducción transforma el ácido quínico en ácido siquímico y ácido dihidrosiquímico.

Estudios realizados en *Lactobacillus hilgardii* describieron que era capaz de degradar el ácido gálico y la catequina presentes en medios de cultivo complejos (Alberto *et al.* 2004) dando lugar, en el caso del ácido gálico a pirogalol, catecol, los ácidos protocatéquico y *p*-hidroxibenzoico, alcohol *p*-hidroxibenzoico, y *p*-hidroxibenzaldehído; mientras que en los cultivos con catequina se detectó ácido gálico, pirogalol, catecol, ácido *p*-hidroxibenzoico, acetovainillona, y ácido homovainílico. Por otro lado, se ha observado que *O. oeni* puede metabolizar antocianinas y otros compuestos fenólicos para producir compuestos aromáticos con

importancia en las características sensoriales del vino. También se ha descrito que algunos aromas del vino se producen mediante la hidrólisis de sustancias precursoras glicoconjugadas, por la acción de glicosidasas de *O. oeni* (Vivas *et al.*, 1997; Boido *et al.*, 2002; Ugliano *et al.*, 2003; de Revel *et al.*, 2005).

Bloem *et al.* (2007) observaron que *O. oeni* y *Lactobacillus sp.* transformaban el ácido ferúlico a vainillina aunque con bajo rendimiento, mientras que cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* lo transformaron en 4-vinilguayacol. En general todas las cepas de bacterias lácticas utilizadas en su estudio redujeron la vainillina a su correspondiente alcohol vainillinico

2.1.1. Metabolismo de ácidos hidroxicinámicos en bacterias lácticas

Los estudios realizados en bacterias lácticas indican la existencia de dos posibles rutas metabólicas para la transformación de los ácidos hidroxicinámicos. Las bacterias lácticas pueden tener una de estas rutas o ambas simultáneamente (**Figura 3**).

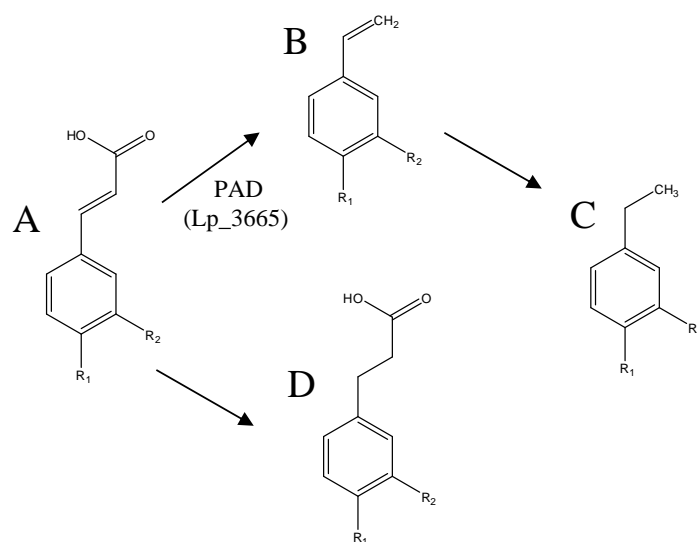


Figura 3. Representación esquemática de la transformación de ácidos hidroxicinámicos por *L. plantarum*. Cuando R1 (OH) y R2 (H), los compuestos representados son ácido *p*-cumárico (A), 4-vinilfenol (B), 4-etilfenol (C) y ácido florético (D). Cuando R1 (OH) y R2 (OH), ácido cafeico (A), 4-vinilcatecol (B), 4-etilcatecol (C) y ácido hidrocafeico (D). Cuando R1 (OH) y R2 (OCH3), los compuestos representados son ácido ferúlico (A), 4-vinilguayacol (B), 4-etilguayacol (C) y ácido hidroferúlico (D). Los compuestos representados en A se descarboxilan para originar los compuestos representados en B por acción de la descarboxilasa PAD (Lp_3665).

La primera ruta implica que algunos ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, cafeico y ferúlico) se pueden descarboxilar para producir los correspondientes vinil derivados (4-vinilfenol, 4-vinilcatecol, y 4-vinilguayacol, respectivamente) los cuales a continuación son reducidos a etil derivados (4-etilfenol, 4-etilcatecol, y 4-etilguayacol) (Cavin *et al.* 1993; Chatonnet *et al.* 1992, 1997; Stead, 1993). Esta ruta implica la actividad secuencial de dos actividades enzimáticas. La primera es la descarboxilasa de ácidos fenólicos (PAD) que cataliza la descarboxilación del ácido hidroxicinámico para producir el correspondiente vinil fenol. La segunda es una actividad reductasa de vinil fenoles que reduce el vinil fenol producido por la PAD a su correspondiente etil fenol.

La segunda ruta para la reducción de ácidos hidroxicinámicos se describió por primera vez en *Lactobacillus pastorianus* (Whiting y Carr, 1959). Esta ruta implica una actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos que reduce directamente los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, cafeico o ferúlico) a ácidos fenilpropiónicos sustituidos (ácidos florético, hidrocaféico o hidroferúlico, respectivamente) (Barthelmebs *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2008a).

Un estudio realizado en *L. plantarum* mostró que una cepa en la que se inactivó la enzima descarboxilasa PAD (Barthelmebs *et al.*, 2000) era capaz de producir, aunque débilmente, ácidos fenilpropiónicos sustituidos. Este resultado demuestra que las dos rutas implicadas en la reducción de ácidos hidroxicinámicos pueden coexistir y competir por la degradación de estos ácidos en este microorganismo. Sin embargo, la utilización de las dos rutas descritas para la reducción de ácidos hidroxicinámicos no es universal y es variable dentro de las bacterias lácticas.

La utilización de la primera ruta que implica la descarboxilación inicial del ácido, se ha estudiado por Couto *et al.* (2006) en 20 especies de bacterias lácticas (35 cepas en total). Los resultados indicaron que el 37% de las cepas estudiadas fueron capaces de producir vinil derivados a partir de ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, sólo un 9% de los productores de vinil derivados fueron capaces de reducir éstos a etil derivados. Las bacterias lácticas productoras de etil fenoles

pertenecían únicamente al género *Lactobacillus* y a las especies *L. plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *L. collinoides*. En estudios posteriores algunos de estos resultados se han ratificado y se han añadido nuevas especies capaces de reducir los vinil derivados como *P. pentosaceus* (Silva *et al.*, 2011). Otras bacterias lácticas, entre las que se encuentran *O. oeni* y *L. hilgardii*, no poseen la enzima descarboxilasa PAD y tampoco son capaces de reducir los ácidos hidroxicinámicos (de la Rivas *et al.*, 2009). Mediante experimentos de PCR realizados en *O. oeni*, *L. hilgardii* y *L. mesenteroides* no se detectó la presencia del gen *pad* que codifica la enzima descarboxilasa PAD y tampoco se observó la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos en estas bacterias. Por el contrario se corroboró la presencia del gen *pad* en *L. brevis* y se observó la producción de 4-vinilfenol, 4-vinilguayacol y 4-vinilcatecol en cultivos suplementados con los respectivos ácidos hidroxicinámicos (de las Rivas *et al.*, 2009). Curiel *et al.* (2010) estudiaron la degradación de ácidos hidroxicinámicos en tres cepas de *L. brevis* que provenían de hábitats diferentes (vino, saliva humana y heces humanas). Contrariamente a lo descrito para otras cepas de esta especie (Cavin *et al.*, 1993 y Couto *et al.*, 2006), los tres aislados fueron incapaces de producir los etil derivados producto de la reducción de los vinil derivados obtenidos mediante la descarboxilación de los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico.

2.2 Metabolismo de compuestos fenólicos en *Lactobacillus plantarum*

Dentro de las bacterias lácticas, la especie *L. plantarum* se caracteriza, entre otras cosas, por ser la que presenta más variabilidad de supervivencia en diferentes ambientes con una diversidad fenotípica muy elevada (Rodríguez *et al.*, 2009). Actualmente, según la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) existen 183 cepas de *L. plantarum* cuyo genoma se está secuenciando. De ellos, actualmente, sólo hay 25 genomas de los que se tiene la secuencia completa. El primer genoma secuenciado completamente de una cepa de *L. plantarum* fue el de la cepa WCFS1, aislada de

saliva humana, número de acceso NC_004567.2 (Kleerebezem *et al.*, 2003). Los tamaños del genoma de todas estas cepas superan los 3,1 millones de bases (Mb) siendo el de la cepa *L. plantarum* WCFS1 el de mayor tamaño con un cromosoma de 3,3 Mb, más tres plásmidos de 1,9, 2,3 y 36,1 kilobases (kb), este hecho le proporciona a *L. plantarum* un mayor potencial metabólico. Se ha relacionado la capacidad de adaptación a diferentes ambientes con el gran tamaño de su genoma y la presencia de genes que codifican numerosas proteínas involucradas en el metabolismo de azúcares y proteínas reguladoras (Kleerebezem *et al.*, 2003 y Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Dadas estas características *L. plantarum* es la especie utilizada más frecuentemente como cultivo iniciador en la fermentación de vegetales donde los compuestos fenólicos son muy abundantes.

Los primeros estudios realizados sobre el metabolismo de compuestos fenólicos en *L. plantarum* los llevó a cabo Whiting (1975). En ellos se describió que *L. plantarum* reducía el ácido quínico a los ácidos carboxílicos dihidroxiciclohexanoico y acético a través de una ruta metabólica que incluye 11 reacciones mediadas por enzimas inducibles. Por otra parte, también se describió que en condiciones anaerobias de crecimiento, esta bacteria reducía el ácido quínico y al mismo tiempo oxidaba una porción del sustrato a catecol, en una ruta que incluye la participación de una reductasa NAD-dependiente y de una descarboxilasa del ácido protocatéquico.

Posteriormente, Ciafardini *et al.* (1994) y Marsilio *et al.* (1996) describieron la degradación del compuesto fenólico más abundante en aceitunas, la oleuropeína, por varias cepas de *L. plantarum*. Inicialmente la actividad de una β -glucosidasa origina la aglicona de oleuropeína que posteriormente, por la actividad de una esterasa, se transforma en hidroxitirosol y ácido elenólico.

Se ha observado que ciertas cepas de *L. plantarum* aisladas de vinos y otros alimentos fermentados, así como también de muestras colorrectales de algunos mamíferos, presentan la capacidad de degradar taninos mediante una enzima con actividad tanasa (Osawa *et al.*, 2000; Nishitani y Osawa, 2003; Nishitani *et al.*,

2004). Ayed y Hamdi (2002) determinaron las condiciones óptimas de concentración de glucosa y pH en las cuales la enzima tanasa de *L. plantarum* es activa. Posteriormente, Iwamoto et al. (2008) identificaron el gen *tanLpI* (o *tanB_{Lp}*) que codifica una enzima con actividad tanasa o tanin acil hidrolasa (TanLpI o TanB_{Lp}). Rodríguez et al. (2008c) estudiaron la capacidad de *L. plantarum* CECT 748^T para degradar taninos hidrolizables utilizando para ello tres ácidos tánicos comerciales y concluyeron que la biotransformación ocurre vía una despolimerización de los taninos de alto peso molecular y una reducción de los de bajo peso. Como resultado de la degradación de los taninos, se producía la formación de ácido gálico y pirogalol.

Rodríguez et al. (2008c) describieron que la transformación del ácido gálico en *L. plantarum* se lleva a cabo a través de una reacción de descarboxilación no oxidativa que da origen a pirogalol. Posteriormente se describió la caracterización de la enzima responsable de la descarboxilación del ácido gálico en *L. plantarum* (Jiménez et al., 2013).

Cavin et al. (1993) realizaron los primeros estudios sobre la transformación de ácidos hidroxycinámicos en *L. plantarum*. Demostraron que los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico se transforman por la acción de la enzima descarboxilasa de ácidos fenólicos (PAD) en sus vinil derivados y luego éstos por la actividad de una reductasa no identificada, se metabolizan a 4-etilfenol, 4-etilguayacol y 4-etilcatecol, respectivamente (Cavin et al., 1997a; Barthelmebs et al., 2000; Landete et al., 2007; Rodríguez et al., 2008b). Cavin et al. (1997b) purificaron y caracterizaron la enzima PAD de *L. plantarum* estableciendo que se trataba de una enzima inducible. Posteriormente, Barthelmebs et al. (2000), en estudios realizados con una cepa mutante que tenía interrumpido el gen que codifica la descarboxilasa PAD (*pad*), describieron que *L. plantarum* posee una reductasa de ácidos fenólicos inducible no identificada. Esta enzima reduce los ácidos fenólicos a ácidos fenil propiónicos sustituidos convirtiendo los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y caféico en los ácidos florético, hidroferúlico e hidrocaféico (Barthelmebs et al., 2000a; Rodríguez et al., 2008a).

Estos resultados demuestran que *L. plantarum* es un claro ejemplo de la coexistencia de las dos rutas implicadas en la reducción de ácidos hidroxicinámicos, y cuyas enzimas implicadas (reductasa de ácidos hidroxicinámicos y reductasa de vinil fenoles) permanecen sin identificar tanto en *L. plantarum* como en otras bacterias lácticas que poseen estas rutas.

3. Reductasas de ácidos hidroxicinámicos

Una oxidorreductasa es una enzima que cataliza la transferencia de electrones desde una molécula donante (el agente reductor) a una molécula aceptora (el agente oxidante) (**Figura 4**). No obstante, el metabolismo de estas reacciones puede ser menos patente y consistir en la reducción u oxidación de grupos funcionales, lo que suele implicar a coenzimas que también cambian su estado redox, como pueden ser los compuestos NADH/NAD^+ , $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, FAD/FADH_2 o FMN/FMNH_2 . Cuando en la reacción se utiliza, por ejemplo NAD^+ , éste actúa como oxidante o aceptor de electrones y el compuesto que resulta oxidado es el reductor o donante de electrones.

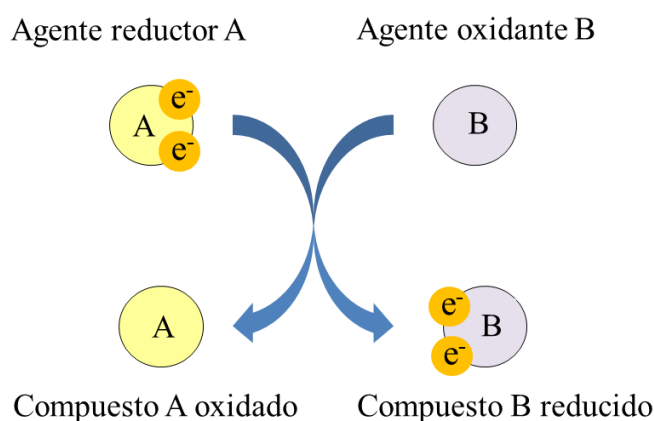


Figura 4. Representación de la reacción catalizada por oxidorreductasas

Hasta 2010, el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) había clasificado casi 1200 tipos distintos de oxidorreductasas (Monti *et al.*, 2011). En el código clásico de 4 dígitos

propuesto en 1961 para las enzimas (EC a.b.c.d), a las oxidoreductasas se les ha asignado el número “1” en la posición “a”. En la posición “b” se indica el grupo funcional que resulta oxidado o reducido (**Tabla 1**)

Tabla 1. Clasificación de enzimas oxidoreductasas según la base de datos de enzimas BRENDA (www.brenda-enzymes.org)

Clase	
EC 1.1	Grupos CH-OH
EC 1.2	Grupos aldehído o cetona
EC 1.3	Grupos CH-CH
	EC 1.3.1 NAD ⁺ / NADP ⁺
	EC 1.3.2 Citocromo
	EC.1.3.3 Oxígeno
	EC 1.3.5 Quinona
	EC 1.3.7 Proteína Fe/S
	EC 1.3.99 Otros
EC 1.4	Grupos CH-NH ₂
EC 1.5	Grupos CH-NH
EC 1.6	NADH / NADPH
EC 1.7	Compuestos nitrogenados
EC 1.8	Grupos sulfurados
EC 1.9	Grupo hemo
EC 1.10	Grupo difenoles
EC 1.11	Peróxido
EC 1.12	Hidrógeno
EC 1.13	Un donante, oxígeno molecular
EC 1.14	Dos donantes, oxígeno molecular
EC 1.15	Superóxido
EC 1.16	Iones metálicos
EC 1.17	Grupos CH o CH ₂
EC 1.18	Proteínas Fe/S
EC 1.19	Flavodoxina
EC 1.20	Fósforo / Arsénico
EC 1.21	Enlaces x-H/y-H formando x-y
EC 1.97	Otros

A pesar de que el grupo de enzimas con actividad oxidoreductasa es muy amplio, tal como muestra la **Tabla 1**, las reductasas implicadas en la reducción de los ácidos hidroxicinámicos estarían incluidas en la clase “EC 1.3” que incluye a las oxidoreductasas que actúan sobre un grupo CH-CH. En la tercera posición de esta nomenclatura generalmente se indica el tipo de donante o aceptor implicado. Aunque en principio no se conoce el donante o aceptor implicados en las reductasas

de ácidos hidroxicinámicos de *L. plantarum*, los estudios realizados por Whiting (1975) parecen indicar la existencia de una reductasa NAD-dependiente en la reducción del ácido quínico. Las enzimas que actúan con NAD^+ o NADP^+ como donante o aceptor se incluyen en la clase “EC. 1.3.1”. De hecho, dentro de las 80 clases distintas de enzimas que utilizan NAD^+ o NADP^+ se encuentra la clase *o*-cumarato reductasa (EC. 1.3.1.11) que pudiera ser similar a la reductasa de ácidos hidroxicinámicos presente en *L. plantarum* y otras bacterias lácticas que cataliza la reducción del ácido *p*-cumárico en ácido florético. Sin embargo, no se ha encontrado una clase de oxidorreductasa que pudiera catalizar una reacción similar a la actividad reductasa de vinil fenoles presentes en *L. plantarum* y en otras bacterias lácticas.

La actividad *o*-cumarato reductasa (EC. 1.3.1.11) se ha definido tomando como base a una única actividad descrita en 1964 en extractos de la bacteria *Arthrobacter* sp. Extractos celulares de esta bacteria fueron capaces de catalizar la reducción del ácido *o*-cumárico a ácido 3-(2-hidroxifenil) propiónico o ácido melilótico en presencia de NADH (Levy, 1964; Levy y Weinstein, 1964). La actividad reductasa de *Arthrobacter* sp. fue muy específica para ácido *o*-cumárico puesto que los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico se redujeron con sólo un 1,4, 0,4 y 0,6% de la actividad mostrada en ácido *o*-cumárico.

La falta total de información sobre las enzimas reductasas implicadas en la reducción tanto de los ácidos hidroxicinámicos como en la reducción de vinil fenoles hace muy interesantes y novedosos los estudios encaminados a la identificación genética y bioquímica de este tipo de enzimas bacterianas.

Objetivos



Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que influyen notablemente en las características organolépticas de los alimentos de origen vegetal. Los ácidos fenólicos representan cerca de un tercio del total de los compuestos fenólicos presentes en la plantas. Entre los ácidos fenólicos, los ácidos hidroxicinámicos son los más frecuentes e incluyen a los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico. La presencia de bacterias lácticas en sustratos vegetales con alto contenido en compuestos fenólicos refleja la capacidad que presentan estos microorganismos para transformar estas sustancias. *Lactobacillus plantarum* es la especie de bacteria láctica utilizada con mayor frecuencia como cultivo iniciador en la fermentación de alimentos de origen vegetal ricos en ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, en la actualidad se dispone de información incompleta de la transformación de estos compuestos en *L. plantarum* y aunque se han descrito las rutas metabólicas implicadas, no se han caracterizado genética ni bioquímicamente algunas de las enzimas involucradas. *L. plantarum* transforma los ácidos hidroxicinámicos mediante dos rutas. La primera ruta implica la reducción directa de los ácidos a los correspondientes ácidos fenilpropiónicos sustituidos. La segunda implica la descarboxilación de estos ácidos a vinil derivados y la posterior reducción de los mismos a sus etil derivados correspondientes. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la escasa información sobre las enzimas reductasas implicadas en el metabolismo de ácidos hidroxicinámicos, en esta memoria se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Identificación y caracterización de la enzima reductasa de ácidos hidroxicinámicos en *L. plantarum*
2. Identificación y caracterización de la enzima reductasa de vinil fenoles en *L. plantarum*

Material y Métodos



1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado los plásmidos y las estirpes bacterianas indicados en las **Tablas 2 y 3** respectivamente, así como los oligonucleótidos sintéticos descritos en la **Tabla 4**.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Genotipo/Fenotipo relevante	Referencia/Origen
pURI3-Cter	Derivado de pT7-7, Amp ^R	Curiel <i>et al.</i> , 2011
pURI3	Derivado de pT7-7, Amp ^R	Curiel <i>et al.</i> , 2011
pURI3-Cter-1424	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-1425	Amp ^R	Este estudio
pURI3-1425	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter -1424+1425	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-3125	Amp ^R	Este estudio
pUCE191	Derivado de pUC19, Amp ^R , Em ^R	Arrecubieta <i>et al.</i> , 1995
pUCE191-1422*	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191-1424*	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191-1425*	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191-1426*	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191-3124*	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191-3125*	Amp ^R , Em ^R	Este estudio

Amp^R, resistente a ampicilina; Em^R, resistente a eritromicina

Tabla 3. Estirpes bacterianas empleadas en este trabajo

Estirpe ^a	Genotipo/Fenotipo relevante	Referencia/Origen ^b
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	<i>F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZAM15 ΔlacX74 recA1 endA1</i> <i>deoR araD139 Δ(ara leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL nupG λ–</i>	Durfee <i>et al.</i> , 2008
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]</i> <i>ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene 1) i21</i> <i>Anin5 T1</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990/Novagen
BL21 (DE3) pURI3-Cter-PAD	Derivada de <i>E.coli</i> BL21 (DE3); pURI3-Cter-PAD	Rodríguez <i>et al.</i> , 2008b
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		
DSM 20680	Cepa silvestre	DSMZ
<i>Enterococcus durans</i>		
DSM 20633	Cepa silvestre	DSMZ
<i>Enterococcus faecalis</i>		
DSM 20478	Cepa silvestre	DSMZ
<i>Enterococcus faecium</i>		
CECT 4102, DSM 20477	Cepas silvestres	CECT, DSMZ
<i>Enterococcus gallinarum</i>		
DSM 24841	Cepa silvestre	DSMZ
<i>Enterococcus hirae</i>		
DSM 20160	Cepa silvestre	DSMZ
<i>Lactobacillus brevis</i>		
CECT 216, CECT 4121, ATCC 367 (CECT 5354)	Cepas silvestres	CECT
<i>Lactobacillus fermentum</i>		
CECT 4007	Cepa silvestre	CECT
<i>Lactobacillus fructivorans</i>		
CECT 4785	Cepa silvestre	CECT
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		
CECT 4786	Cepa silvestre	CECT
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>		
DSM 10641 (ATCC 10776), DSM 10667 ^T (ATCC 10667 ^T)	Cepas silvestre y cepa tipo	DSMZ
<i>Lactobacillus pentosus</i>		
DSM 16366, DSM 20199, DSM 20314 ^T	Cepas silvestres y cepa tipo	DSMZ
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
WCFS1 (NCIMB 8826)	Cepa silvestre	Kleerebezem <i>et al.</i> , 2003/NCIMB
WCFS1Δ <i>lp</i> ₁₄₂₂	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp</i> ₁₄₂₂	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp</i> ₁₄₂₄	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp</i> ₁₄₂₄	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp</i> ₁₄₂₅	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp</i> ₁₄₂₅	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp</i> ₁₄₂₆	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp</i> ₁₄₂₆	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp</i> ₃₁₂₄	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp</i> ₃₁₂₄	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp</i> ₃₁₂₅	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp</i> ₃₁₂₅	Este estudio
CECT 220 (ATCC 8014), CECT 221 (ATCC 14431), CECT 223, CECT 224, CECT 749 (ATCC 10241), CECT4645	Cepas silvestres	CECT
DSM 1055, DSM 2648, DSM 10492, DSM 13273, DSM 20246, NC8	Cepas silvestres	DSMZ
RM28, RM31, RM35, RM38, RM39, RM40, RM41, RM71, RM72, RM73	Cepas silvestres	De las Rivas <i>et al.</i> , 2009/IFI
<i>subsp. argentorantensis</i>		
DSM 16365 ^T	Cepa tipo	DSMZ
<i>subsp. plantarum</i>		
CECT 748 ^T (ATCC 14917 ^T), DSM 20174	Cepa tipo y cepa silvestre	CECT, DSMZ
<i>Lactobacillus sakei</i>		
<i>subsp. carnosus</i>		
DSM 15831	Cepa silvestre	DSMZ
<i>Leuconostoc citreum</i>		
CECT 4025, CECT 4700	Cepas silvestres	CECT
<i>Streptococcus gallolyticus</i>		
UCN 34 (CIP110142)	Cepa silvestre	Dr. Philippe Glaser (Instituto Pasteur, Francia)

^a, cepa tipo.

^b NCIMB, *National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria*, Scotland, UK; CECT, *Colección Española de Cultivos Tipo*; DSMZ, *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*; ; IFI, *Instituto de Fermentaciones Industriales*

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' → 3')
597	GGGTAATCGGCCACATTGG
598	CTGCTGCCTCCCGTAGGA
697	CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAACGAGAAAAATATAAACACA
698	ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACTTATTAAATAATTTATAGCTATT
877	GGGGTACCTGCTGTCAAAGAAGTGACG
878	GCTCTAGAAAGCTAAAATCACCGCATCAGC
890	GCTATTAATGATGATGATGATGATGGGCCGTCACCGGATCAACGTGCTC
891	GGGGTACCGGTGTAATGATTCAAAGTG
892	GCTCTAGATCCCGTCCTGAGCCATTTTG
918	AACCGCGACAATGTTTTGATT
919	TTGTGAACGGCAGTTTCAGTGT
965	ATGACGTTAGCAAAACATGA
976	ATGAAATTTGTTGGGATT
1051	GGGGTACCAACCAGCTTATATGA
1052	GCTCTAGATGAAAGTCGGTGATCCAA
1222	CACTGGTGATGCCAAATATTGAA
1223	GCCCTGATCATCAAAAGCTTGT
1224	CGGCAGCCCTGACCAA
1225	GCCGGCATCAACGTAACG
1226	TGACATCGACTGGCCCAAT
1227	TGCCCTTTGTCAATGCTTCA
1228	GGGGTACCGAACAGCACCAAGTAGC
1229	GCTCTAGAAATCTGGCGTAAGTGC
1233	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
1242	ATGAAATTTGTTGGAATTGTTG
1243	ATGCAAAAACATAATGCCAGTC
1327	CTTTTTCAACATTGCGGATGC
1328	CATTAACGCTTGGGGCAAAGG
1329	GACTTATTATCAATATTTGACG
1330	CGTCAGCCGTCGCAATTTTAGTGG
1331	GACTTGCCCATCATCGCCTTGC
1332	CGATAAAGTCGCCTTTAGGTAATTG
1333	CAGTCCCGAACAAGTGACGCG
1385	TGCCGTGGCACCATTTTAC
1470	CATGCCTGGAACCTGTGTTG
1471	TGCCGACCGGAATTGC
1516	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGTTAGCAAAACATGAT
1517	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGATGACTAACGATTGACTGCT
1627	TCGGCTGGTACCTATTGCCCTA
1628	AACTTGGCGTCGTCTAGATGAC
1630	ATGCCAAAATCAGATTCCAGCGA
1631	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATTTGTTGGGATTGTTGGGA
1632	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGTTTCCTCCCCAGTCACTTGCCGCCA
1633	CAGGGTACCTATTACCGGCCTTA
1634	GTTGAGCTTTCTAGACTGTAATAT
1635	ATGGATCTTGACCGGCTACAGA
1655	CARATHYTNGAYGCNCCNGGNGT
1656	CATCATYTGNGWRAANCCCATNCC
1657	GAYVTNGTNGTNGTNGG
1658	CCNGCNGCRTANAGNCC
1684	CAACGGTATAGTTATCATTCGC
1685	TGTTAGTTGCGTTGAACCAAGC

```

1686 TGCTCATAGTCTTGAATAAACG
1687 GAATATCGTTCACAGCGGACAG
1688 CAGTAGGAACATTAAATTGACG
1689 TCGCCGGCACCCATTGCTTGTACG
1690 ACTGGTTGTAGTACTGCCAGTTGC
1717 CCTTTGCCCCAAGCGTTA
1718 GTGAATGCTCGGCTGGAAA
1719 GCTGCGCAACAAGGCTATG
1720 CCGGGACCGGTTTGATTT
1791 CATCATGGTGACGATGACGATAAGATGAAA
1792 AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTATTAGGC
1810 GCCACGTTCTCATTAAAGGTCCG
1811 CTTAATTGGTCGTCAACAACAGG
1812 CATTGATGTCAGCAATGGCTAG
1813 CACTAGCTGCCAATCTTAGCACCAC

```

Los sitios de corte para las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* están subrayados

2. Medios y condiciones de cultivo

Las especies de bacterias lácticas, de manera general, se cultivaron en medio MRS (Pronadisa, España) a 30 °C sin agitación. Las cepas de *Enterococcus* se cultivaron en medio BHI (Pronadisa, España) a 37 °C sin agitación. Para los cultivos en medio sólido se añadió agar al 1,5%. La concentración final de antibiótico utilizada para el cultivo de cepas resistentes fue 10 µg/mL para eritromicina y 100 µg/mL para lincomicina.

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron rutinariamente en el medio de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) a 37 °C en agitación. Para los cultivos en medio sólido se añadió agar al 1,5%. Para aumentar la solubilidad de las proteínas en los casos que fue necesario se utilizó medio LB suplementado con D-sorbitol 1M y betaína 2,5 mM (Ackerley *et al.*, 2004). Cuando se requirió, se añadió ampicilina al medio a una concentración final de 100 µg/mL.

Todas las cepas se conservaron congeladas a -80 °C en el medio de cultivo al que se añadió glicerol estéril al 10% (concentración final).

3. Técnicas de ADN

3.1. Extracción de ADN cromosómico

El ADN cromosómico de las bacterias lácticas se aisló utilizando el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las bacterias se cultivaron en 10 mL de medio MRS a 30 °C durante 16 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 12500 x g durante 5 min. Las células sedimentadas se lavaron una vez en 500 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM; NaCl 100 mM). El sedimento se resuspendió en 600 µL de solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) conteniendo 10 mg/mL de lisozima (Sigma) y se incubó durante 30 min a 37 °C.

Para producir la lisis celular, se adicionaron 70 µL de SDS (Sigma) al 10% y 10 µL de proteinasa K (20 µg/mL) (Sigma) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez lisado el cultivo, el ADN se desproteinizó mediante dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Con el fin de precipitar el ADN cromosómico, se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) y el tubo se agitó lentamente hasta que apareció el ADN como un precipitado. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. Finalmente, el ADN se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; 1 mM EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN se almacenó a -20 °C.

3.2 Extracción de ADN plasmídico

3.2.1 Extracción rápida

Con el fin de seleccionar las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos recombinantes portadores del gen de interés, se utilizó un método rápido de extracción de plásmidos a partir de colonias crecidas en medio sólido. Para llevar a cabo la extracción del ADN plasmídico, la colonia se cogió con una punta estéril y se resuspendió en 20 µL de una solución compuesta por lisozima 0,5 mg/mL, EDTA 25

mM pH 8,0, Tris HCl 25 mM pH 7,5, RNasa 0,1 mg/mL, azul de bromofenol al 0,02% y glicerol al 0,015%. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se añadieron 5 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 12500 x g durante 2 min. A continuación se recogieron 10 μ L de la fase superior acuosa y se realizó una electroforesis convencional en geles de agarosa. Las células transformadas con los plásmidos recombinantes se seleccionaron mediante la diferencia de tamaño con respecto al ADN plasmídico original debido a la presencia de los genes clonados.

3.2.2 Extracción de alta pureza

Para obtener un ADN plasmídico de mayor pureza, se realizó la extracción con los sistemas comerciales *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) y *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* (FAVORGEN Biotech Corp) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraídos se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR

La amplificación de ADN se llevó a cabo utilizando reactivos adquiridos a las casas comerciales *Applied Biosystems* y *Takara Biotechnology*.

Durante los procesos de amplificación de ADN se llevaron a cabo reacciones en un volumen final de 25 o 50 μ L, conteniendo una ADN polimerasa termoestable, tampones de reacción, desoxinucleótidos (dNTPs), ADN molde y los oligonucleótidos utilizados como cebadores. Se han utilizado las siguientes ADN polimerasas: *AmpliTaq Gold*TM (*Applied Biosystems*) a una concentración final de 0,025 U/ μ L y *PrimeSTAR*TM HS (*Takara Biotechnology*) a una concentración final de 1,25 U/ μ L siguiendo las instrucciones de los proveedores. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores fueron sintetizados por *MWG Operon Technologies*. Las mezclas de reacción fueron las siguientes: para la polimerasa *AmpliTaq Gold*TM se empleó MgCl₂ a una concentración 2 mM en la mezcla final, el tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM), los dNTPs a una concentración final de 0,25 mM, una

concentración de oligonucleótidos de 1 μM y una concentración de enzima de 0,025 U/ μL ; para la polimerasa *PrimeSTARTM HS* se utilizó un tampón de reacción con MgCl_2 5 mM en la mezcla final, una concentración final de dNTPs de 0,2 mM, la concentración de oligonucleótidos fue 0,3 μM y una concentración de enzima de 1,25 U/ μL . En ambos casos el ADN molde se añadió al final.

Las reacciones de PCR consistieron en 30 ciclos de tres fases cada uno: fase de desnaturalización de ADN (95 °C durante 30 s para *AmpliTaq GoldTM* y 98 °C durante 10 s para *PrimeSTARTM HS*), una fase de hibridación de los oligonucleótidos con el ADN molde a 55 °C de 30 s para *AmpliTaq GoldTM* y 5 s para *PrimeSTARTM HS* y una fase de elongación de DNA realizada a 72 °C durante un tiempo proporcional al tamaño del fragmento a amplificar. La reacción de amplificación con la enzima *AmpliTaq GoldTM* tiene una etapa inicial de 10 min a 95 °C para activar la enzima.

3.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para resolver las muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa al 0,7% ó 2% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,0, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM). El mismo tampón se utilizó como electrolito. A las muestras se les añadió un 20% de su volumen de una solución compuesta por azul de bromofenol al 0,25%, xilencianol FF al 0,25% y glicerol al 30% en agua. La electroforesis se realizó a 90 V y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con *GelRedTM Nucleic acid Gel Stain* (Biotium) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor. Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante radiación ultravioleta ($\lambda=302$ nm) en un sistema de captura y análisis de imágenes *ChemIDoc XRS⁺* (Bio-Rad). Como marcadores de tamaño se utilizaron ADN del fago Lambda cortado con *EcoT14I* (Takara) y el marcador *100 bp ladder* (Biotools).

3.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Este proceso se llevó a cabo mediante el kit *QIAquick Gel extraction* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor.

3.6. Métodos de clonación

3.6.1. Método de clonación independiente de ligación (LIC)

Para este estudio se utilizaron los vectores de expresión pURI3 (de las Rivas et al., 2007) y pURI3-Cter (Curiel et al., 2011), pertenecientes a la familia pURI, para realizar la clonación de los genes de interés mediante el método de clonación independiente de ligación (LIC) descrito por de las Rivas *et al.* (2007).

Los vectores pURI3 y pURI3-Cter se construyeron a partir del plásmido comercial pT7-7 (de las Rivas et al., 2007). El vector pURI3 presenta una secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS constituida por un residuo de metionina seguida de una cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina y la secuencia de reconocimiento para la proteasa enteroquinasa (DDDDK). Esta secuencia líder continua con la metionina inicial de la proteína de interés, una región intergénica no codificante de 230 pb que contiene la diana de restricción *NotI* y finalmente cuatro codones de terminación en tándem.

El vector pURI3-Cter presenta la secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS, constituida por un residuo de metionina en el extremo amino terminal y la cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina se localiza 280 pb tras ese residuo de metionina, seguida de cuatro codones de terminación en tándem. De esta forma la cola de histidinas se inserta en el extremo C-terminal del gen clonado.

Con respecto al proceso de clonación se amplificaron los genes con la ADN polimerasa *PrimeSTARTM HS* (Takara) utilizando los oligonucleótidos mencionados en la **Tabla 4**. Estos oligonucleótidos se diseñaron con extremos 5' complementarios

a regiones presentes en los vectores de expresión. De esta manera, en una segunda amplificación utilizando el vector como molde y el gen amplificado como cebador, los extremos 5' hibridan en el plásmido, permitiendo a la enzima ADN polimerasa copiar el resto del plásmido y la consiguiente inserción del gen de interés en el mismo.

Para seleccionar los plásmidos que contienen el gen de interés, se realizó una digestión de la mezcla anterior con la enzima *DpnI* (Roche) durante 10 horas a 37 °C, ya que estos no presentan secuencias metiladas y por lo tanto no van a ser digeridos por dicha enzima. En algunos clonajes se llevó a cabo una segunda digestión con *NotI* (Takara) durante 4 horas a 37 °C en tampón H (Takara), ya que esta diana de restricción se encuentra en la región intergénica no codificante presente sólo en el plásmido original y no en los plásmidos que han incorporado el inserto. Cuando el inserto presentó la diana de restricción *NotI* no se realizó dicha digestión. Posteriormente, ambas enzimas se inactivaron mediante una incubación a 65 °C durante 25 min y una vez inactivadas, las células competentes de *E. coli* DH10B se transformaron con el producto de la digestión (ver apartado 4 de Material y Métodos). Como medio de selección se utilizaron placas de LB suplementadas con ampicilina a 100 µg/mL.

3.6.2. Método de clonación con enzimas de restricción

Este método se empleó para clonar fragmentos de los genes de interés en el vector pUCE191 (Amp^R y Em^R) (Arrecubieta *et al.*, 1995) con el fin de interrumpirlos posteriormente en *L. plantarum* mediante un proceso de inserción-duplicación por recombinación homóloga ya que el plásmido pUCE191 no replica en *L. plantarum*.

Los plásmidos derivados de pUC presentan un fragmento del gen *lacZ* que codifica los primeros 146 aminoácidos de la β-galactosidasa LacZ, dentro de este fragmento se encuentra el lugar de clonaje múltiple (MCS) del plásmido sin interrumpir el marco de lectura. Cuando se utilizan estos plásmidos para transformar cepas que producen el fragmento perteneciente a la zona C-terminal de esta enzima, como es el caso de *E. coli* DH10B, tiene lugar un proceso de α-complementación que

dará lugar a la proteína completa. Por el contrario, si se clonara un gen, o fragmento de gen, en el MCS no se produciría esta α -complementación ya que no se sintetizaría el fragmento N-terminal de LacZ. Esto servirá posteriormente para seleccionar colonias en placas.

Los fragmentos se amplificaron mediante PCR usando el ADN cromosómico de *L. plantarum* como molde. Los cebadores se diseñaron incorporando las dianas de restricción de *KpnI* y *XbaI* de tal forma que los fragmentos amplificados presentaban estas dianas en sus extremos 5' y 3' respectivamente. Tanto los fragmentos amplificados como el vector se digirieron con ambas enzimas, se purificaron siguiendo el método de purificación en geles de agarosa mencionado en el apartado 3.5 y posteriormente se ligaron usando la enzima *T4 DNA ligase* (USB) durante 16 horas a 4 °C. Finalmente con el producto de la ligación se transformó *E.coli* DH10B (ver apartado 4.1 de Material y Métodos).

3.7. Secuenciación de ADN y análisis de la información

La secuenciación de ADN se realizó en la empresa Secugen (<http://www.secugen.es>). Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377* (Applied Biosystems) con el kit de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems) con terminadores fluorescentes y la ADN polimerasa *AmpliTaq FS* (Applied Biosystems). El programa BLAST, herramienta perteneciente al NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) se utilizó para la búsqueda de secuencias similares depositadas en las bases de datos de EMBL y GenBank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). Los alineamientos múltiples de las secuencias se llevaron a cabo la herramienta Clustal Omega proporcionada por el EMBL-EBI: (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La predicción de secuencias promotoras y la predicción de terminadores de la transcripción se llevaron a cabo en el portal de internet (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) y (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/index.php>) respectivamente. El cálculo del punto isoeléctrico y el peso molecular se analizaron en EXPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/).

4. Transformación genética de cepas bacterianas

4.1. Transformación genética en *Escherichia coli*

Para la transformación genética de *E. coli*, se prepararon células competentes obtenidas mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983). Las células competentes se obtuvieron cultivando células de *E. coli* DH10B o BL21 (DE3) en 100 mL de LB hasta una DO_{600} de 0,48, posteriormente se mantuvieron en hielo durante 30 min y el cultivo se centrifugó a $3800 \times g$ durante 7 min a 4 °C. El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de la solución TFB I (RbCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, KOAc 30 mM, $CaCl_2$ 10 mM y glicerol 15%) durante 90 min a 4 °C. Pasado ese tiempo, la suspensión celular se centrifugó a $3800 \times g$ durante 7 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió suavemente en 4 mL de la solución TFB II (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM y glicerol 15%) hasta obtener una suspensión homogénea de células competentes. La suspensión se repartió en alícuotas de 200 μ L y éstas se conservaron a -80 °C.

La transformación de las células obtenidas se realizó incubándolas con el plásmido (100 ng) durante 15 min en hielo, seguido de 3 min a 37 °C y de 5 min en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de LB a las células y se incubaron a 37 °C durante una hora. Terminada la incubación las células transformadas se seleccionaron en placas de LB conteniendo el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias.

Las colonias de *E. coli* DH10B transformadas con las construcciones realizadas en pUCE191 se crecieron en placas de LB suplementadas con ampicilina (100 μ g/mL), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma, Alemania) (0,2 mM), utilizado como inductor del gen *lacZ*, y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) (0,04 mg/mL). Este último se hidrolizará por acción de la enzima β -galactosidasa y tras oxidarse originará un compuesto azul (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) en aquellas colonias en las que se produzca la α -complementación, mientras que las colonias en las que no haya complementación al tener un fragmento clonado en el plásmido serán blancas.

4.2. Transformación genética en *Lactobacillus plantarum*

La obtención de células electrocompetentes de *L. plantarum* y la transformación de las mismas se llevó a cabo mediante el método descrito por Aukrust y Blom (Aukrust y Blom, 1992). Con objeto de obtener células de *L. plantarum* electrocompetentes con una pared celular permeable, éstas se cultivaron en un medio MRS modificado (MRS*). Este medio MRS* se diferencia del medio MRS convencional (de Man *et al.*, 1960) en que se ha sustituido la glucosa, principal fuente de carbono, por el aminoácido glicina (1%). En las células Gram+ esta modificación del medio provoca una alteración en la organización del peptidoglicano, debilitando la pared celular y aumentando su permeabilidad (Hammes *et al.*, 1973). Las células se incubaron con este medio a 30 °C durante 18 h. Posteriormente, con objeto de restaurarlas, se añadió glucosa (1% concentración final) al cultivo y éste se incubó hasta una DO₆₀₀ de 0,6, momento en el que se centrifugó el cultivo a 3000 x g durante 5 min a 4 °C. El sedimento celular se lavó con MgCl₂ (1 mM) y después con polietilenglicol (PEG-1500) al 30%. Finalmente el sedimento celular volvió a resuspenderse suavemente en PEG-1500 al 30% en frío, en una centésima parte del volumen del cultivo inicial.

La transformación se llevó a cabo mediante electroporación, añadiendo 200 µg de plásmido (apartado 3.6.2 de Material y Métodos) a 40 µL de células electrocompetentes de *L. plantarum*. La mezcla se pasó a cubetas de electroporación y se aplicaron los siguientes parámetros: 400 Ω, 25 µF y 1,50 kV en un equipo *Gene Pulser XcellTM* (Bio-Rad). Las células transformadas se cultivaron en medio MRS suplementado con 0,5 M de sacarosa y 0,1 M de MgCl₂ a 30 °C sin agitación durante 2 h permitiendo así la reconstitución de la pared celular. Las células transformadas se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con lincomicina (10 µg/mL) y eritromicina (100 µg/mL).

4.2.1 Interrupción genética en *Lactobacillus plantarum*

Con objeto de confirmar la participación de las reductasas identificadas en esta tesis en el metabolismo de ácidos hidroxicinámicos, se llevó a cabo la interrupción de los genes de *L. plantarum* que las codifican mediante un proceso de inserción-duplicación utilizando un plásmido no replicativo a través de un proceso de recombinación homóloga. Para ello, se amplificaron fragmentos internos de los genes mediante PCR y se clonaron en el plásmido pUCE191 según el método del apartado 3.6.2. (Material y Métodos) ya que pUCE191 replica en *E. coli* pero es incapaz de replicar en *L. plantarum*.

A partir de las células de *E. coli* DH10B transformadas se extrajeron los plásmidos recombinantes conteniendo los fragmentos internos de los genes de interés. Posteriormente, las células competentes de *L. plantarum* se transformaron con los plásmidos obtenidos (ver apartado 4.2 de Material y Métodos).

Las células transformadas de *L. plantarum* presentan en su cromosoma el resultado de la recombinación homóloga entre el gen nativo cromosómico y el correspondiente fragmento interno clonado en el plásmido pUCE191, produciéndose la consiguiente interrupción génica por inserción-duplicación. Dichos transformantes se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con eritromicina (10 µg/mL) y lincomicina (100 µg/mL).

Para evitar la selección de mutantes espontáneos resistentes a dichos antibióticos, se comprobó la presencia del plásmido pUCE191 en el interior de las células transformadas mediante amplificación por PCR del gen que confiere resistencia a eritromicina, utilizando los oligonucleótidos 697 y 698 (**Tabla 4**). Además, se comprobó la correcta integración de los plásmidos en el interior de los genes seleccionados de *L. plantarum* mediante amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido complementario al plásmido pUCE191 (oligonucleótido 1233) (**Tabla 4**) y uno complementario a una región externa al fragmento del gen interrumpido.

5. Técnicas de ARN

5.1. Extracción de ARN

Las células de *L. plantarum* se cultivaron en medio MRS sin agitación a 30 °C durante 16-18 h. Los ensayos se llevaron a cabo en cultivos líquidos de 50 mL. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} entre 0,8-0,9 se añadió el compuesto en estudio y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Los cultivos se realizaron por triplicado para cada condición ensayada. Como control, se utilizaron cultivos de *L. plantarum* sin compuesto. Posteriormente, los cultivos se colocaron en un baño de agua/hielo durante 7 min y se centrifugaron a 4.600 x g a 4 °C durante 5 min en una centrífuga *Sorvall RC 6 Plus* (Thermo Scientific).

Para la extracción del ARN se siguió un protocolo previamente descrito (Saulnier *et al.*, 2007). Después de la centrifugación del cultivo, el sedimento celular se homogeneizó en 4 volúmenes (1 mL) de tampón *Quenching* (HEPES 66,7 mM en metanol 60%, pH 6,5) en frío (-20 °C). Posteriormente, la biomasa celular se separó mediante centrifugación a 11.200 x g durante 10 min a -10 °C y se le añadió la mezcla de extracción conteniendo 400 µL de fenol ácido, pH 4,5, 100 µL de cloroformo, 30 µL de SDS 10%, 30 µL de acetato sódico 3M, pH 5,2, 400 µL de tampón TE y 500 mg de esferas de vidrio (425-600 micrones, Sigma-Aldrich) previamente tratadas con ácido nítrico al 66% durante 48 h a temperatura ambiente y lavadas con agua libre de nucleasas (agua DEPC) (Sambrook *et al.*, 1989). La suspensión celular resultante se agitó 3 veces en un equipo *FastPrepTM Fp120* (Savant) a 5.000 rpm durante 40 s. Entre cada ciclo de agitación los viales se enfriaron durante 2 min en nieve carbónica. El lisado obtenido se centrifugó a 18.900 x g durante 2 min a 4 °C y se eliminaron los restos de proteínas del sobrenadante mediante dos extracciones sucesivas con 500 µL y 400 µL de cloroformo a 4 °C. Finalmente, se recogió la fase superior acuosa, que contiene el ARN, y se congeló inmediatamente a -80 °C.

5.2. Validación de las muestras de ARN

La concentración y pureza del ARN se valoró en un espectrofotómetro *NanoDrop 2000TM* (Thermo Electron Corporation). La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza del ARN se evaluó observando las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (libre de nucleasas). En el ARN, se observaron las bandas correspondientes al ARN de las subunidades 23S y 16S ribosómicas con igual intensidad. La banda correspondiente al ARN de la subunidad 5S no se observó en la mayoría de las muestras. La presencia de un mayor número de bandas o pérdida de intensidad de la banda 23S se consideró indicativo de degradación del ARN.

5.3. Tratamiento del ARN con DNAsa

La presencia de trazas de ADN en el ARN purificado es habitual, siendo imprescindible eliminarlo para evitar datos erróneos en los estudios de expresión génica. El ADN se eliminó utilizando la enzima DNAsa I (Ambion), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, el ARN se incubó con 2 μ L de la enzima DNAsa I a 37 °C durante 1 h, repitiendo el tratamiento hasta conseguir la eliminación del ADN. Por último, a la mezcla se añadieron 20 μ L del reactivo de inactivación comercial, se incubó 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 18.890 x g durante 1 min para recuperar en el sobrenadante el ARN limpio. La eliminación del ADN se comprobó mediante PCR.

5.4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real

5.4.1. Síntesis del ADNc mediante la enzima transcriptasa inversa

Para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se sintetizó el ADNc a partir del ARN puro, empleando el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor. Para ello, 1 µg de ARN se mezcló con 1 µL de la enzima transcriptasa inversa en un volumen final de 20 µL conteniendo 2 µL de oligonucleótidos universales, 0,8 µL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 µL de inhibidor de nucleasas y 2 µL de tampón. La reacción se llevó a cabo indistintamente en un termociclador *Mastercycler personal 5332* o en un *Mastercycler gradient 5331* (Eppendorf) a 25 °C durante 10 min seguido de 2 h a 37 °C y de un periodo de inactivación a 85 °C durante 5 s. En todos los casos se incluyó un control negativo sin ARN molde.

5.4.2. Diseño de oligonucleótidos para el análisis mediante RT-qPCR

Los oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar los fragmentos internos de los genes de interés mediante PCR cuantitativa se diseñaron utilizando el programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems). Las secuencias de los genes se tomaron de la base de datos GenBank[®] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Las secuencias y oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 4**.

5.4.3. Ensayo de RT-qPCR

Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el sistema *7500 Fast* (Applied Biosystems). Se utilizó el método que emplea como fluorocromo *SYBR Green*, que se intercala en las moléculas de ADN y permite la detección directa de los productos de PCR. Este fluorocromo presenta una longitud de onda de excitación máxima a 494 nm y una emisión máxima a 521 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado empleando 12,5 µL de *SYBR Green real-time PCR Master Mix 2X* (Applied

Biosystems) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl_2 , los dNTPs y el fluorocromo, 5 μL de cada uno de los oligonucleótidos específicos a una concentración de 200 μM y el ADNc en un volumen final de 25 μL en agua libre de nucleasas. La amplificación se inició con una activación inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos donde cada ciclo incluyó dos etapas: una a 95 °C durante 15 s (desnaturalización) y otra a 60 °C durante 1 min (hibridación/elongación).

El análisis por RT-qPCR en la modalidad de cuantificación absoluta se utilizó para validar la calidad del ADNc con el fin de verificar la ausencia de ADN contaminante en las muestras de ARN empleadas. Para ello se compararon los valores de los ciclos umbrales (C_t) (*cycle threshold*) resultantes tras realizar una RT-qPCR empleando los oligonucleótidos 597-598, que amplifican un fragmento del gen *ARNr 16S* de *L. plantarum*, y utilizando como molde para la reacción el ARN y el ADNc correspondientes a cada uno de los cultivos (tanto del grupo control sin adición del compuesto, como los que lo contienen). Un ADNc se consideró óptimo y se utilizó en los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR cuando la variación $C_t \text{ ADNc} - C_t \text{ ARN}$ fue igual o superior a 10 ($\Delta C_t \geq 10$).

Paralelamente, todas las parejas de oligonucleótidos se validaron elaborando una curva patrón que utiliza los valores C_t resultantes de amplificar mediante RT-qPCR cantidades decrecientes conocidas del ADN. Mediante el análisis de la curva “disociación-temperatura de fusión” (T_m) y realizando un análisis electroforético en geles de agarosa al 2% se verificó que en todos los ensayos tuvo lugar la amplificación de un único producto con lo cual se descarta la formación de dímeros de los oligonucleótidos. Seguidamente se obtuvieron las gráficas del valor C_t vs el \log_{10} de la concentración de ADN y se aplicó un ajuste de regresión lineal con el cálculo de los coeficientes de correlación (R^2). La ecuación de cada recta se utilizó para obtener el valor de la pendiente (que debe ser negativo e inferior a -3,15), y éste se empleó para calcular la eficiencia de la reacción (E) para cada pareja de oligonucleótidos mediante la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Pfaffl, 2001).

Se seleccionó como gen endógeno el gen *ldhD* previamente utilizado en estudios llevados a cabo frente a los compuestos utilizados en esta tesis (Reveron *et al.* 2012). Los oligonucleótidos empleados para su amplificación fueron el 918 y 919. La expresión de cada gen se normalizó frente al gen seleccionado como “control endógeno”.

El análisis de la expresión génica se realizó mediante un estudio transcriptómico por RT-qPCR que evaluó la expresión relativa de los genes. Dicha cuantificación relativa permitió conocer cambios en la expresión de los genes de reductasas estudiados en presencia de los ácidos hidroxicinámicos y derivados analizados con respecto a las muestras control sin tratar. El valor de la expresión relativa de los genes (RQ) se determinó mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El ADNc del grupo control (sin adición del compuesto fenólico) se definió como calibrador (donde el nivel RQ se corrige a 1). Aquellos genes cuyas RQ mostraron valores iguales o superiores a 2 veces (*fold change* (FC) $\geq \pm 2$ veces) con respecto al control se consideró que presentaron una expresión diferencial. Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas, se realizó la comparación de medias mediante una prueba *t* de Student de dos colas utilizando GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6. Técnicas de proteínas

6.1. Preparación de extractos proteicos

Los extractos proteicos libres de células se obtuvieron a partir de cultivos de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) Para ello, los cultivos se centrifugaron a $7.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C. El sedimento se sometió a tres lavados en solución salina para eliminar restos del medio y, posteriormente, se resuspendió en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. Esta suspensión celular se rompió mediante tres pases por una prensa de French (*Amicon French pressure cell, SLM Instruments*) a una presión de 1.100 psi y posteriormente el lisado se centrifugó a $17.400 \times g$ durante 40 min para eliminar las células completas y los restos celulares. Todo el proceso se realizó a 4 °C. El

sobrenadante obtenido se filtró con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore) y los extractos proteicos libres de células así obtenidos se utilizaron para los ensayos enzimáticos en el momento de su preparación.

Los extractos proteicos se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se añadieron 5 µL de la muestra a analizar a 1 mL del reactivo *Bradford Protein Assay* (Bio-Rad) diluido en agua destilada (1:4). A continuación se agitó la mezcla y se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La curva patrón se realizó utilizando diferentes concentraciones de la proteína seroalbúmina bovina en las mismas condiciones.

6.2. Hiperproducción y purificación de enzimas recombinantes

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de las proteínas con actividad reductasa estudiadas en esta tesis, los genes que las codifican se clonaron en los vectores de expresión pURI3 y pURI3-Cter de la familia pURI (Curiel *et al.*, 2011) mediante el sistema de clonación LIC (de las Rivas *et al.*, 2007). Estos vectores de expresión presentan promotores inducibles por IPTG y una secuencia que codifica una cola de afinidad de seis histidinas (His6), con objeto de hiperproducir y purificar las proteínas recombinantes en un único paso.

Inicialmente se transformaron células de *E. coli* DH10B con el plásmido para su propagación pero para la expresión se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) puesto que es necesario la presencia de la ARN polimerasa T7 del fago defectivo DE3. Los cultivos se incubaron a 37 °C en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) en agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,4-0,6, se indujeron añadiendo IPTG a una concentración final de 0,4 mM. Se ensayaron diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación valorando así las condiciones óptimas para la producción de las proteínas recombinantes. La inducción se ensayó a 22 °C, 30 °C y 37 °C durante 4 y 16 h con agitación y, en la mayoría de los casos, se observó que las condiciones óptimas de inducción fueron a 22 °C y 16 h. Algunas proteínas presentaron problemas de solubilización por lo que se cultivaron durante 5 días a 22

°C en medio LB suplementado con betaina y D-sorbitol (Ackerley *et al.*, 2004) induciéndose con IPTG (0,25 mM) desde el principio.

Finalizado el periodo de inducción, las células se recogieron mediante centrifugación a 7.000 x g durante 15 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en tampón Tris 20mM pH 8 con NaCl 100 mM y se rompieron mediante prensa de French para obtener el extracto celular conteniendo la enzima recombinante soluble. Finalmente, el extracto se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore).

Una vez obtenido el extracto filtrado éste se puso en contacto con 1 mL de resina TALON® (Clontech) de cobalto durante 20 min a temperatura ambiente. La resina con cobalto se equilibró previamente con tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7. Una vez unida la proteína a la resina, se realizó un lavado con fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7, un segundo lavado con este mismo tampón pero conteniendo 10 mM de imidazol y posteriormente, la proteína recombinante se eluyó con 150 mM de imidazol en el mismo tampón.

La pureza de la enzima se determinó en geles de SDS-PAGE del 10% o del 12,5%, lo cual permitió conocer las fracciones que contenían la proteína. Dichas fracciones se dializaron frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7 a 4 °C utilizando membranas de diálisis (CelluSep) de 3,5 kDa de diámetro de poro. Se realizaron cuatro cambios de tampón para eliminar el imidazol presente en la muestra.

La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de cada proteína (<http://web.expasy.org/protparam/>).

6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utiliza geles de poliacrilamida a una concentración de acrilamida dependiente del tamaño molecular de las proteínas a

analizar (Laemmli, 1970). Las muestras que contenían la proteína a resolver se hirvieron durante 5 min en presencia de un tampón Tris-HCl 6,5 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, utilizando como electrolito el tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las proteínas presentes en los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma). Como marcador de masa molecular se empleó *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (BioRad).

6.4. Identificación de proteínas mediante huella peptídica y fragmentación MALDI TOF/TOF

Con objeto de identificar el fragmento obtenido a partir de la hidrólisis de la proteína pura, la banda correspondiente del gel SDS-PAGE se cortó y analizó mediante MALDI TOF/TOF. Dicha identificación se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC, Madrid.

Brevemente, se realizó una digestión de la muestra con la proteasa tripsina y, posteriormente, ésta se analizó en el espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF *Autoflex III* (Bruker). El espectro de masas resultante presentó una serie de masas (m/z) que correspondían a los péptidos trípticos característicos de la proteína presente en la muestra. Esas masas y sus fragmentaciones se combinaron y enfrentaron a una base de datos de proteínas (NCBI^{nr}). Empleando el motor de búsqueda *Mascot* se compararon todas las masas trípticas teóricas de las proteínas contenidas en la base de datos frente a las masas experimentales obtenidas a partir de la muestra. El resultado fue una lista de candidatos estadísticamente validados con una determinada puntuación (score) para un $p < 0,05$.

6.5. Ensayos de actividad enzimática

6.5.1. Ensayos con extractos de *Escherichia coli*

Los primeros ensayos de actividad se realizaron con extractos de *E.coli* BL21(DE3) obtenidos tal y como se describe en el apartado 6.1 de Material y Métodos e incubándolos durante 5 días con los diferentes sustratos. Todos se añadieron a una concentración final de 1,5 mM. Las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 37 °C durante dieciséis horas. Posteriormente los compuestos fenólicos se extrajeron usando un tercio del volumen de la reacción de acetato de etilo y se filtraron en filtros de polifluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (Teknokroma) para luego analizarlos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (apartado 6.6 de Material y Métodos).

6.5.2. Ensayos con proteínas puras

La actividad enzimática de proteínas puras sobre el ácido *m*-cumárico (en el caso de Lp_1424 y Lp_1425) o 4-vinilfenol (en el caso de Lp_3125) se realizó con una concentración de proteína 10 o 100 µg/mL en tampón fosfato 50 mM a pH 7,0. En las reacciones a las que se añadió el cofactor, la enzima se incubó previamente durante 10 min a 4 °C o bien con FMN o FAD, o ambos, a una concentración 250 µM. Como donadores de electrones se usaron el NADH o NADPH 500µM que se añadieron posteriormente (Hertzberger *et al.*, 2014) y, por último, el compuesto fenólico a ensayar a una concentración de 1,5 mM (volumen final de la reacción 1 mL). La reacción se incubó a 37 °C durante 16 h. Como controles se utilizaron los sustratos incubados en el tampón en las mismas condiciones pero sin enzima. Posteriormente los compuestos fenólicos presentes se obtuvieron mediante dos extracciones con un tercio del volumen de acetato de etilo y se filtraron en filtros de PVDF de 0,45 µm (Teknokroma) para luego analizarlos mediante HPLC (apartado 6.6. de Material y Métodos).

6.5.3. Ensayos en cultivos de bacterias lácticas

Para estudiar la capacidad que tienen diferentes cepas de bacterias lácticas para reducir algunos ácidos hidroxycinámicos o compuestos derivados (ácidos *p*-cumárico, *m*-cumárico, *o*-cumárico, ferúlico, cafeico y sinápico; 4-vinilfenol, 4-vinilguayacol, 4-vinilcatecol), éstas se cultivaron durante 5 días a 37 °C sin agitación utilizando su medio de cultivo correspondiente (apartado 2 de Material y Métodos) conteniendo una concentración 1.5 mM del compuesto fenólico a ensayar. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 7.000 x g durante 2 min. Los compuestos fenólicos se obtuvieron mediante dos extracciones con un tercio del volumen de acetato de etilo y se filtraron en filtros de PVDF de 0,45 µm (Teknokroma) para luego analizarlos mediante HPLC (apartado 6.6. de Material y Métodos).

6.6. Análisis de actividad enzimática mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para el análisis mediante HPLC se utilizó un equipo cromatográfico *Thermo* (Thermo Electron Corporation) equipado con una bomba P4000 *Spectra System*, un inyector automático AS3000 y un detector de fotodiodos alineados UV6000LP. La muestra se inyectó en un cartucho *Nova-pack C18* (25 cm x 4,0 mm d.i. x 4,6 µm de tamaño de partícula) en fase inversa con un gradiente de fase A (agua:ácido acético, 98:2) y B (agua:acetonitrilo:ácido acético, 78:20:2) a temperatura ambiente. El programa de elución utilizado fue el siguiente: 0-55 min, 80% B lineal, 1,1 mL/min; 55-57 min, 90% B isocrático, 1,2 mL/min; 70-80 min, 95% B lineal, 1,2 mL/min; 80-90 min, 100% lineal, 1,2 mL/min; 100-120 min, lavado a 1 mL/min. La detección de los sustratos y los productos de degradación se realizó mediante un barrido de 220 a 380 nm (Bartolomé *et al.*, 2000). Las muestras se filtraron en filtros de PVDF de 0,45 µm (Teknokroma) y se inyectaron por duplicado para su análisis.

La identificación de los productos de la degradación se llevó a cabo mediante comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción de cada pico con estándares comerciales.



Resultados y Discusión

1. Metabolismo de ácidos hidroxicinámicos

Las plantas superiores sintetizan un numeroso grupo de moléculas orgánicas, designadas como metabolitos secundarios. Dentro de este grupo, los ácidos fenólicos son muy abundantes en el reino vegetal. La presencia de estos ácidos fenólicos se asocia a propiedades organolépticas de alimentos de origen vegetal como el color y otras propiedades sensoriales, así como propiedades nutricionales y antioxidantes (Shahidi y Naczki, 2004; Vanbeneden *et al.*, 2008).

Los ácidos fenólicos representan un tercio de los compuestos fenólicos consumidos en la dieta, por lo que existe un creciente interés por el estudio de sus propiedades antioxidantes y de sus posibles efectos beneficiosos en la salud del consumidor (Dimitrios, 2006; Kapur y Kapoor, 2001; Lodovici *et al.*, 2001).

El término “ácido fenólico”, en general incluye compuestos que poseen, al menos, un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico como grupo funcional (Lynd *et al.*, 2002; Robbins, 2003). Los ácidos fenólicos presentes en la naturaleza se pueden agrupar en dos grupos en función de su estructura: los ácidos hidroxicinámicos y los ácidos hidroxibenzoicos. Los ácidos hidroxibenzoicos son los componentes de estructuras complejas como los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos). Los ácidos hidroxicinámicos son más abundantes que los ácidos hidroxibenzoicos y fundamentalmente son los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Estos ácidos raramente aparecen en su forma libre, excepto en alimentos procesados que se han congelado, esterilizado o fermentado. Los ácidos hidroxicinámicos suelen encontrarse como derivados glicosilados o ésteres con los ácidos quínico, sikímico y tartárico (Manach *et al.*, 2004). El ácido cafeico se combina con el ácido quínico para originar el ácido clorogénico. El ácido cafeico, tanto en su forma libre como esterificada, es el ácido fenólico más abundante y representa entre el 75% y el 100% de los ácidos hidroxicinámicos de la mayoría de frutas. Por su parte el ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante en los cereales (Shahidi y Naczki, 2004). Existen tres tipos de isómeros del ácido cumárico: *orto* (*o*), *meta* (*m*) y *para* (*p*)

-cumárico. El ácido *p*-cumárico es el isómero más abundante del ácido cumárico, puede encontrarse de forma libre en las plantas pero lo más frecuente es que se conjugue con otros componentes como alcoholes, mono y polisacáridos y aminas (Pei *et al.*, 2016).

Dependiendo de su estructura los ácidos hidroxicinámicos pueden ejercer diversos efectos en el crecimiento y viabilidad de las bacterias, por lo que constituyen un sistema de defensa antibiótica para las plantas (Pragasam *et al.*, 2013). Algunas especies bacterianas han desarrollado diferentes vías para metabolizar los ácidos fenólicos. Estos procesos ganan importancia a la hora de procesar y conservar alimentos de origen vegetal puesto que la concentración de estos metabolitos va a influir en las diferentes características organolépticas y nutricionales.

Lactobacillus plantarum es la especie de bacteria láctica que se aísla más frecuentemente en la fermentación de alimentos de origen vegetal ricos en compuestos fenólicos (Klaenhammer *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Con objeto de conocer si las cepas de *L. plantarum* eran capaces de degradar los ácidos hidroxicinámicos se llevó a cabo un doble abordaje experimental. Por un lado se realizaron cultivos de *L. plantarum* en presencia de diversos ácidos hidroxicinámicos puesto que si *L. plantarum* era capaz de metabolizar estos ácidos, en los sobrenadantes de los cultivos se podrían detectar los productos finales de degradación. Por otro lado, las proteínas solubles presentes en los extractos celulares de cultivos de *L. plantarum* se incubaron en presencia de los mismos ácidos con objeto de conocer las enzimas inducibles implicadas en la degradación de los mismos (Rodríguez *et al.*, 2008b).

Se comprobó que los sobrenadantes de cultivos de *L. plantarum* crecidos en ácido *p*-cumárico mostraban la presencia de vinil y etilfenol, originados por la descarboxilación y posterior reducción del ácido *p*-cumárico. Se observó una situación similar en el caso del ácido cafeico en donde en el sobrenadante del

cultivo se identificaron el producto de la descarboxilación (4-vinilcatecol) así como el producto de la descarboxilación y posterior reducción (4-etilcatecol). Al igual que en el caso de los ácidos *p*-cumárico y cafeico, el ácido ferúlico se metabolizó de una manera similar (Rodríguez *et al.*, 2008b).

En las reacciones utilizando los extractos celulares de *L. plantarum*, se comprobó que sólo se descarboxiló una proporción de ácido *p*-cumárico, obteniéndose 4-vinilfenol. Una situación similar se obtuvo en la reacción con ácido cafeico, en las que el extracto celular descarboxiló parte del ácido presente en la reacción detectándose 4-vinilcatecol. Sin embargo, los extractos celulares de *L. plantarum* no fueron capaces de descarboxilar el ácido ferúlico presente. Con ninguno de los ácidos se observó la reducción de los vinil derivados producidos. Además se ensayaron otros ácidos hidroxicinámicos (ácido *o*-cumárico, *m*-cumárico, cinámico y sinápico), de los que sólo el ácido *m*-cumárico se redujo en los cultivos de *L. plantarum* a ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico (3-HPPA).

Estos resultados indican que las enzimas implicadas en la reducción de los vinil derivados de los ácidos hidroxicinámicos al igual que la reductasa de ácido *m*-cumárico necesitan sintetizarse después de su inducción por la presencia de estos ácidos fenólicos y por ello estas actividades enzimáticas no están presentes en los extractos celulares y si en los cultivos en los que se han inducido dichas enzimas.

Todos los resultados expuestos anteriormente indican que el metabolismo de ácidos hidroxicinámicos implica la acción secuencial de dos enzimas, en primer lugar los ácidos se descarboxilan a sus vinil derivados, los cuales por acción de una reductasa inducible se pueden reducir a los correspondientes etil derivados.

La descarboxilasa implicada en la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos (*phenolic acid decarboxylase* o PAD) se ha caracterizado

molecular y bioquímicamente (Cavin *et al.*, 1997a; Rodríguez *et al.*, 2008b). Esta descarboxilasa transforma sólo los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico en los correspondientes vinil derivados (Cavin *et al.*, 1997b; Rodríguez *et al.*, 2008b). Mediante la inactivación del gen que codifica la descarboxilasa PAD se ha comprobado que *L. plantarum* posee una ácido fenólico reductasa inducible, no caracterizada, la cual reduce los ácido fenólicos a ácidos fenil propiónicos sustituidos, y convierte los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico en los ácidos florético, hidroferúlico e hidrocafeico. Se ha sugerido que estas actividades inducibles puedan estar implicadas en la respuesta a estrés inducida por los ácidos fenólicos, convirtiéndolos en compuestos menos tóxicos (Gury *et al.*, 2004).

De todo lo expuesto, se puede concluir que de todas las enzimas implicadas en la transformación de ácidos hidroxicinámicos en *L. plantarum* tan sólo se ha descrito a nivel genético y molecular la descarboxilasa PAD (Lp_3665) (Cavin *et al.*, 1997b; Rodríguez *et al.*, 2008b). Estando completamente desconocidas, tanto a nivel enzimático como genético, las reductasas inducibles implicadas en esta transformación. Por un lado la enzima responsable de la reducción de los ácidos hidroxicinámicos para originar ácidos fenilpropiónicos, y por otro la enzima implicada en la reducción de los vinil fenoles a sus correspondientes etil fenoles (**Figura 3**).

1.1. Identificación de la proteína reductasa de ácidos hidroxicinámicos en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

El estudio del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos en *L. plantarum* indica que la proteína implicada en la reducción de estos ácidos a ácidos fenilpropiónicos es una proteína inducible por la presencia del sustrato, como el ácido *p*-cumárico. Para la identificación de proteínas inducibles se pueden utilizar diversas aproximaciones experimentales, entre los que se encuentran los estudios de cambios globales en el proteoma de la bacteria o bien en la expresión génica de las mismas en respuesta al compuesto en estudio.

Reverón *et al.* (2012) realizaron un estudio transcriptómico global de la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 a la presencia de 1,5 mM de ácido *p*-cumárico. Este estudio reveló la inducción masiva de genes implicados en la resistencia al estrés así como una parada general de los procesos asociados con el crecimiento. También se observó la inducción de genes relacionados con la destoxificación de ácido *p*-cumárico. Dentro de este grupo, el que experimentó una mayor inducción, 112 veces, fue el gen *lp_3665* que codifica la descarboxilasa PAD implicada en la descarboxilación de algunos ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico) (Rodríguez *et al.*, 2008b). Junto a este gen, en presencia de 1,5 mM de ácido *p*-cumárico, también se indujeron los genes *lp_3664* y *lp_3663* con los que forma un operón.

Aparte de *pad*, en este estudio transcriptómico también se indujeron otra serie de genes, varios de ellos posiblemente implicados en las rutas de transporte de electrones. En esta categoría se encuentra el tercer gen más inducido del estudio, *lp_1425*, con una inducción de 19,7 veces, el cual está anotado como “fumarato reductasa/ succinato dehidrogenasa, flavoproteína de unión a FAD, FMN reductasa dependiente de NADPH”. También aparece inducido (4 veces) el gen *lp_3125* que codifica otra posible copia de una fumarato reductasa, (“fumarato reductasa, subunidad flavoproteína”). Además, genes asociados a *lp_1425*, como son los genes *lp_1424* (“proteína de la familia de FMN reductasas dependientes de NADPH”) y *lp_1426* (“proteína de función desconocida”) aparecieron muy inducidos, 15,3 y 7,2 veces, respectivamente.

Los resultados publicados por Reverón *et al.* (2012) muestran que algunos de los genes más inducidos en presencia de ácido *p*-cumárico codifican enzimas con actividad reductasa (como *lp_1425*, *lp_1424* y *lp_3125*). Sin embargo, la anotación de su función específica no coincide con la actividad buscada sobre los ácidos hidroxicinámicos. Hay que tener en cuenta que muchos de los genes identificados mediante la secuenciación de genomas y metagenomas se han anotado en función de su similitud con otras proteínas. Aunque esta

aproximación es rápida y barata, sin embargo, a más del 40% de las secuencias no se les ha asignado ninguna función y muchas de ellas están anotadas incorrectamente (Green y Karp, 2005). La aproximación genómica genera anotaciones referidas a la función bioquímica que debe verificarse experimentalmente. La aproximación experimental definitiva para asignar una función a una proteína es interrumpir esa actividad en el genoma así como producir y caracterizar bioquímicamente la proteína correspondiente (Kuznetsova *et al.*, 2005).

Por ello, con objeto de estudiar la posible implicación de las reductasas codificadas por estos genes en la reducción de los ácidos hidroxicinámicos se decidió interrumpir dichos genes en *L. plantarum* y comprobar la actividad bioquímica presentada por las cepas mutantes. La interrupción se realizó mediante la inserción de un plásmido no replicativo en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1. Con ese propósito se clonaron fragmentos internos de los genes que codifican las posibles reductasas en el plásmido no replicativo pUCE191 (Arrecubieta *et al.*, 1995). Los fragmentos internos fueron 242 pb de *lp_1424* (amplificados con los oligonucleótidos 1228-1229), 271 pb de *lp_1425* (amplificados con 877-878) y 472 pb de *lp_3125* (amplificados con 891-892). Una vez contruídos los plásmidos pUCE191-*lp_1424**, pUCE191-*lp_1425** y pUCE191-*lp_3125** cada uno de ellos se utilizó para transformar *L. plantarum* WCFS1 mediante el protocolo descrito por Aukrust y Blom (1992). La recombinación homóloga que se produce entre el fragmento interno clonado en el plásmido pUCE191 y la copia del gen presente en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1, ocasiona la interrupción del gen de interés (*lp_1424*, *lp_1425* o *lp_3125*) mediante la integración del plásmido en su copia cromosómica.

Se ha descrito que no todas las cepas de *L. plantarum* pueden transformarse con este tipo de método puesto que la eficiencia de transformación de células con plásmidos integrativos en el cromosoma disminuye varios órdenes de magnitud con respecto a la transformación con plásmidos replicativos (Leer *et*

al., 1993). Sin embargo, la cepa *L. plantarum* WCFS1 utilizada en este estudio presenta una adecuada frecuencia de transformación con plásmidos integrativos (Jiménez *et al.*, 2013; Reverón *et al.*, 2017). Por ello, células electrocompetentes de *L. plantarum* WCFS1 se transformaron con los plásmidos pUCE191-1424*, pUCE191-1425* y pUCE191-3125*, obteniendo cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 que poseen los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_3125* no funcionales. La correcta integración de los plásmidos, interrumpiendo el gen de interés, se comprobó mediante PCR utilizando un oligonucleótido que hibrida en el plásmido (oligonucleótido 1233) y otro oligonucleótido que hibrida en el gen de interés, pero en una región externa al fragmento insertado. Para comprobar la correcta integración de los plásmidos, como oligonucleótidos que hibridan en el gen de interés se utilizaron los oligonucleótidos 976 (*lp_1424*), 1242 (*lp_1425*) y 965 (*lp_3125*).

Una vez comprobada la correcta inserción de los plásmidos pUCE191-1424*, pUCE191-1425* y pUCE191-3125* y la consiguiente interrupción de los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_3125* en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1, las células mutantes obtenidas (*L. plantarum* WCFS1Δ1424, *L. plantarum* WCFS1Δ1425 y *L. plantarum* WCFS1Δ3125) se cultivaron en MRS en presencia de ácido *m*-cumárico y de 4-vinilfenol, a una concentración 1,5 mM durante cinco días a 30 °C. Se decidió utilizar ácido *m*-cumárico como sustrato modelo para la reducción de ácidos hidroxicinámicos puesto que se ha descrito que es el único isómero de este ácido que no es sustrato de la enzima descarboxilasa PAD (Lp_3665) (Rodríguez *et al.*, 2008b) y por lo tanto, todo el ácido presente en el medio permanece como sustrato para la reducción, siendo más fácil la detección del producto reducido, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico (3-HPPA).

Terminada la incubación, los compuestos fenólicos se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Los resultados demuestran (**Figura 5**) que las cepas de *L. plantarum* WCFS1 mutadas en los genes *lp_1424* y *lp_1425* pierden la capacidad para transformar el ácido *m*-cumárico

presente en el cultivo en 3-HPPA, demostrándose así la implicación de estos genes en la reducción de los ácidos hidroxicinámicos. Por otro lado, la figura también muestra que sólo la cepa de *L. plantarum* WCFS1 mutada en el gen *lp_3125* pierde la capacidad para reducir el 4-vinilfenol presente en el medio de cultivo. Esto indica la necesidad de una proteína Lp_3125 funcional para reducir los vinil derivados a sus etil derivados.

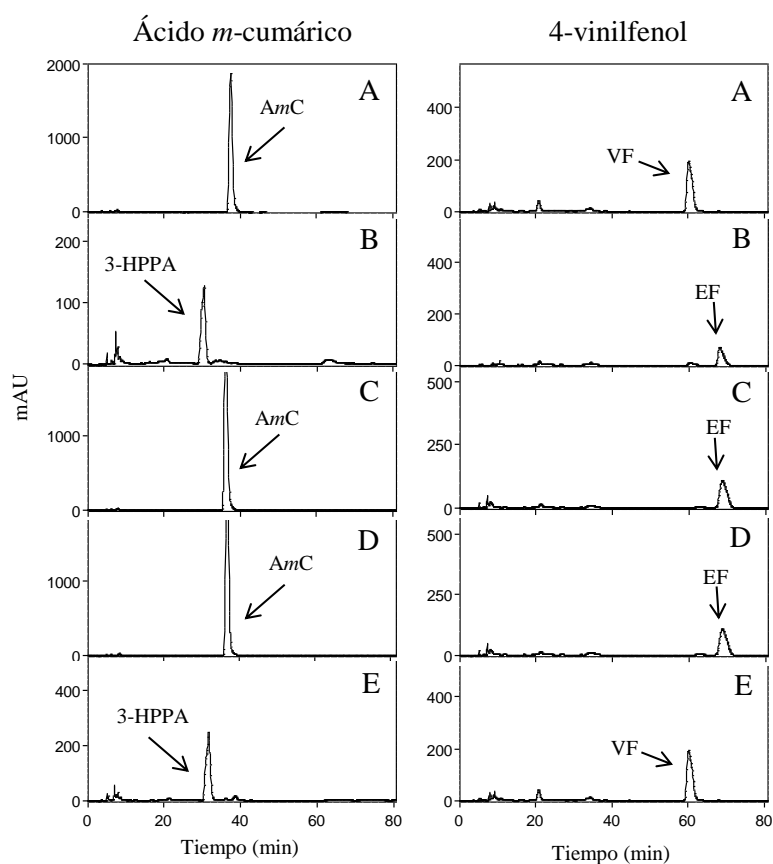


Figura 5. Reducción del ácido *m*-cumárico o 4-vinilfenol en cultivos de *L. plantarum* WCFS1 (B), y de las cepas con genes interrumpidos, *L. plantarum* WCFS1Δ1424 (C), *L. plantarum* WCFS1Δ1425 (D) y *L. plantarum* WCFS1Δ3125 (E), y control del medio (A). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 30°C en medio MRS conteniendo ácido *m*-cumárico o 4-vinilfenol a una concentración de 1,5 mM. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico; 3-HPPA, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico; VF, 4-vinilfenol; EF, 4-etilfenol.

1.1.1. Organización genética de la región adyacente a los genes *lp_1424* y *lp_1425* en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

El estudio de los cultivos de las cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 demuestra que los genes *lp_1424* y *lp_1425* están implicados en la reducción del ácido *m*-cumárico y posiblemente de otros ácidos hidroxicinámicos. Puesto que se trata de genes que aparecen contiguos en el cromosoma, se decidió conocer la organización genética de la región adyacente.

En el análisis de la secuencia de esta región se incluyó la región *lp_1420-lp_1427* que comprende seis marcos de lectura abierta (ORF), dos de ellas corriente arriba (“*upstream*”) y otras dos corriente abajo (“*downstream*”) de los genes implicados en la actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos (**Figura 6A**). Las dos ORFs situadas *upstream* se transcriben divergentemente respecto a *lp_1424* y *lp_1425*, al igual que la última ORF analizada. La primera, *lp_1420*, codifica una proteína 33% idéntica a la peptidasa S41 de *Enterococcus faecalis* (código de acceso S4GJS1). *Lp_1420* codifica una proteína de 323 aminoácidos y 35,5 kDa, anotada como peptidasa S41, pero también como proteinasa que procesa en el extremo carboxilo terminal o como proteína de resistencia a la bacteriocina nisina. La siguiente ORF, *lp_1422*, codifica una proteína de 315 aminoácidos y 35,5 kDa que es 53 % idéntica a un regulador transcripcional de *Lactobacillus dextrinicus* DSM 20335 (acceso A0A0R2BT54). *Lp_1422* está anotada como posible regulador transcripcional o como regulador transcripcional de la familia LysR. Posteriormente se encuentra la primera proteína identificada como implicada en la reducción del ácido *m*-cumárico, *Lp_1424* es una proteína de 204 aminoácidos y 22,9 kDa, que es 70% idéntica a una oxidorreductasa de *Lactobacillus dextrinicus* DSM 20335 (acceso A0A0R2BLE3). *Lp_1424* aparece anotada como posible oxidorreductasa, flavin reductasa, FMN reductasa NADPH-dependiente, precursor de la subunidad flavoproteína de la fumarato reductasa, o como flavoproteína de unión a FAD, fumarato reductasa/succinato deshidrogenasa. La otra proteína

implicada en la reducción del ácido *m*-cumárico es la codificada por el gen *lp_1425*, el cual se encuentra separado por sólo dos nucleótidos del gen *lp_1424*. Lp_1425 es una proteína de 812 aminoácidos y 87,2 kDa, 71% idéntica a una proteína de *Lactobacillus dextrinicus* DSM 20335 (acceso A0A0R1KPL6) anotada como subunidad flavoproteína de la fumarato reductasa. Asimismo, está citada como flavocitocromo c, subunidad flavoproteína de la fumarato reductasa, FMN reductasa NADPH-dependiente o como flavoproteína de unión a FAD, fumarato reductasa/succinato deshidrogenasa. La primera de las ORFs *downstream* es *lp_1426*, que codifica una proteína de 186 aminoácidos y 20,7 kDa, la cual presenta una identidad del 35% con una proteína no caracterizada de *Lactobacillus dextrinicus* DSM 20335 (acceso A0A0R2NGW1). La proteína Lp_1426 de *L. plantarum* está anotada como proteína hipotética. Finalmente, la última ORF analizada es *lp_1427*, que codifica una proteína de 146 aminoácidos y 16,6 kDa. Presenta un 85% de identidad con una proteína anotada como nucleósido 2-deoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 (acceso Q03T94). La proteína Lp_1427 de *L. plantarum* está anotada como nucleósido 2-deoxirribosiltransferasa o como purina trans-desoxiribosilasa.

1.1.2. Análisis transcripcional de la región adyacente a los genes *lp_1424* y *lp_1425* en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

El análisis de la región en la que se encuentran los genes *lp_1424* y *lp_1425* sugiere que ambos genes pueden estar organizados como un operón y transcribirse juntos. Se realizó un estudio *in silico* con objeto de identificar posibles promotores y terminadores de la transcripción. La búsqueda de promotores se realizó utilizando el Berkeley Drosophila Genome Project (http://fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl) para organismos procariotas. La búsqueda de terminadores de la transcripción Rho-independientes se realizó utilizando el programa ARNold Finding Terminators (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/index.php>). *In silico* se identificaron posibles promotores

situados *upstream* de los genes *lp_1420*, *lp_1422*, *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_1427*, identificando también los posibles sitios de inicio de la transcripción. Respecto a los terminadores de la transcripción éstos se situaron *downstream* de *lp_1420*, *lp_1422*, *lp_1426* y *lp_1427* (**Figura 6A**).

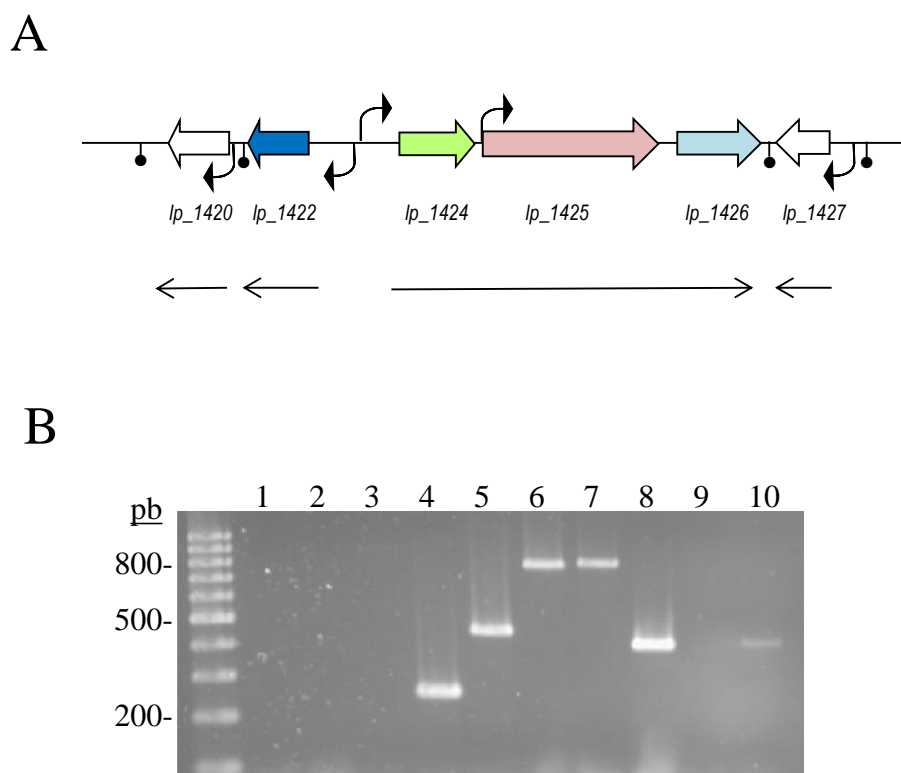


Figura 6. (A). Organización genética de la región adyacente a los genes *lp_1424* y *lp_1425* implicados en la reducción del ácido *m*-cumárico. Se representa la región de *L. plantarum* WCFS1 (número de acceso NC_004567.2, posiciones 1.299.251 a 1.309.330). Las flechas indican genes. Se indica la localización de posibles promotores y terminadores de la transcripción. También se señala el tamaño y dirección de los transcritos obtenidos mediante transcripción reversa. (B) Análisis transcripcional mediante RT-PCR de la región adyacente a los genes *lp_1424* y *lp_1425* implicados en la reducción del ácido *m*-cumárico. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con parejas de oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes o las regiones intergénicas a partir del ADNc de *L. plantarum* WCFS1. Las regiones amplificadas son control sin ADNc (1), región interna de *lp_1422* de 628 pb amplificada con los oligonucleótidos 1328+1329 (2), región intergénica *lp_1422-lp_1424* de 861 pb amplificada con 1327+1229 (3), fragmento interno de *lp_1424* de 241 pb amplificado con 1228+1229 (4), región intergénica *lp_1424-lp_1425* de 432 pb amplificada con 1222+1330 (5), fragmento interno de *lp_1425* de 758 pb amplificado con 877+878 (6), región intergénica *lp_1425-lp_1426* de 778 pb amplificada con 1385+1052 (7), fragmento interno de *lp_1426* de 384 pb amplificado con 1051+1052 (8), región intergénica *lp_1426-lp_1427* de 323 pb amplificada con 1226+1331 (9), y fragmento interno de *lp_1427* de 395 pb amplificado con 1332+1333 (10). En el lado izquierdo se muestra el marcador de peso molecular (100 pb Ladder, Biotools) señalándose algunos de los tamaños.

Con objeto de comprobar estos resultados, se realizaron simultáneamente experimentos de transcripción reversa utilizando ARNm obtenido a partir de *L. plantarum* WCFS1 cultivado en presencia de ácido *p*-cumárico (1,5 mM). El ADNc se sintetizó como se describe en el apartado 5.4.1 de Material y Métodos y el ADNc obtenido se utilizó para amplificar mediante PCR fragmentos internos de los genes *lp_1422* (oligonucleótidos 1328 y 1329, amplifican 628 pb), *lp_1424* (oligonucleótidos 1228 y 1229, amplifican 241 pb), *lp_1425* (oligonucleótidos 877 y 878, amplifican 758 pb), *lp_1426* (oligonucleótidos 1051 y 1052, amplifican 384 pb) y *lp_1427* (oligonucleótidos 1332 y 1333, amplifican 395 pb). De manera similar, se amplificaron las uniones entre las ORFs implicadas: Las regiones intergénicas *lp_1422-lp_1424* (oligonucleótidos 1327 y 1229, amplifican 861 pb), *lp_1424-lp_1425* (oligonucleótidos 1222 y 1330, amplifican 432 pb), *lp_1425-lp_1426* (oligonucleótidos 1385 y 1052, amplifican 778 pb), y por último la unión entre *lp_1426-lp_1427* (oligonucleótidos 1226 y 1331, amplifican 323 pb). Tal como muestra la **Figura 6B**, las regiones intergénicas *lp_1422-lp_1424* y *lp_1426-lp_1427* así como el gen *lp_1422* no produjeron amplificación mediante PCR, lo que indica que estas regiones no se transcribieron en las condiciones utilizadas. De hecho, se identificaron *in silico* posibles terminadores de la transcripción en las regiones *lp_1422-lp_1424* y *lp_1426-lp_1427* con $\Delta G = -10,2$ y $-12,7$ kcal/mol, respectivamente. En contraste, se obtuvo amplificación del tamaño esperado en los genes *lp_1424* (241 pb), *lp_1425* (758 pb), *lp_1426* (384 pb) y *lp_1427* (395 pb) así como en las regiones intergénicas *lp_1424-lp_1425* (432 pb) y *lp_1426-lp_1426* (323 pb).

Estos resultados demuestran que los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_1426* se transcriben juntos, como un ARNm policistrónico. Los tres genes se transcriben formando un operón (**Figura 6A**).

1.1.3. Implicación de los genes adyacentes a *lp_1424* y *lp_1425* en la reducción de ácidos hidroxicinámicos

Se ha descrito en apartados anteriores que la interrupción de los genes *lp_1424* y *lp_1425* en *L. plantarum* origina la pérdida de la capacidad para reducir el ácido *m*-cumárico. Por otro lado, el análisis transcripcional de la región adyacente a estos genes revela que los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_1426* se transcriben juntos, y que el gen *lp_1422*, que codifica un posible regulador transcripcional, se transcribe divergentemente a ellos. Con objeto de conocer la implicación de los genes *lp_1422* y *lp_1426* en la reducción del ácido *m*-cumárico, se interrumpieron dichos genes en *L. plantarum* WCFS1 y se comprobó la actividad bioquímica presentada por las cepas mutantes. La interrupción se realizó utilizando la misma estrategia descrita en apartados anteriores mediante la inserción de un plásmido no replicativo en el cromosoma. Para ello se clonaron fragmentos internos de los genes *lp_1422* y *lp_1426* en el plásmido pUCE191 (Arrecubieta *et al.*, 1995), un fragmento de 335 pb de *lp_1422* (amplificado con los oligonucleótidos 1627-1628), y otro de 366 pb de *lp_1426* (amplificado con 1051-1052). Una vez contruidos los plásmidos pUCE191-*1422** y pUCE191-*1426** cada uno de ellos se utilizó para transformar *L. plantarum* y las colonias recombinantes se seleccionaron por su resistencia a eritromicina. La correcta integración de los plásmidos, se comprobó mediante PCR utilizando el oligonucleótido 1233, que hibrida en el plásmido pUCE191, junto con otro oligonucleótido que hibrida en el gen de interés, pero en una región externa al fragmento insertado. Para el gen *lp_1422* se utilizó el oligonucleótido 1630 y para el gen *lp_1426* el oligonucleótido 1243.

Una vez comprobada la correcta inserción de los plásmidos y la correspondiente interrupción de los genes *lp_1422* y *lp_1426* en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1, se realizaron cultivos de estas cepas junto con *L. plantarum* WCFS1 Δ *1424* y *L. plantarum* WCFS1 Δ *1425* obtenidas previamente. Todas se cultivaron en MRS en presencia de ácido *m*-cumárico a una

concentración 1,5 mM durante cinco días a 30 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación los compuestos fenólicos se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. De los cuatro genes analizados, tan sólo la interrupción del gen *lp_1426* no ocasionaba la pérdida de la capacidad para reducir el ácido *m*-cumárico presente en el cultivo (**Figura 7**). Este resultado demuestra que aunque el gen *lp_1426* se transcribe conjuntamente con los genes *lp_1424* y *lp_1425*, no codifica una proteína que ejerza un papel catalítico en la reducción del ácido *m*-cumárico. De hecho, el gen *lp_1426* codifica una proteína de 186 aminoácidos a la que no se le ha asignado ninguna función específica.

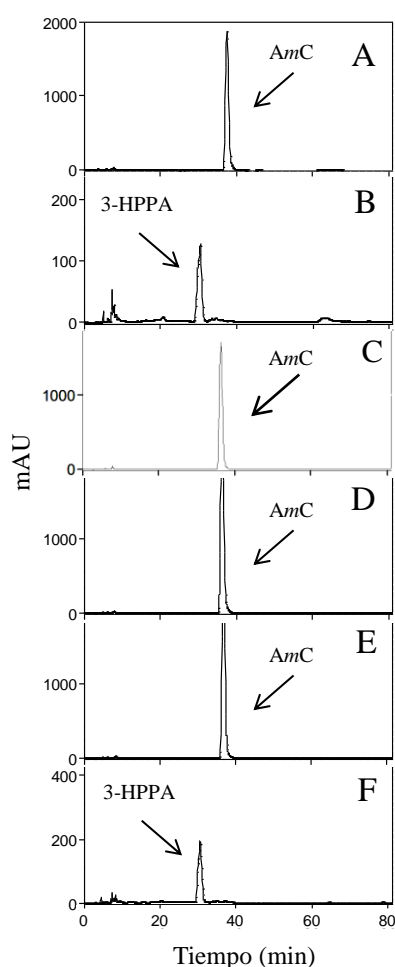


Figura 7. Reducción del ácido *m*-cumárico en cultivos de *L. plantarum* WCFS1 (B), y de las cepas con genes interrumpidos, *L. plantarum* WCFS1Δ1422 (C) *L. plantarum* WCFS1Δ1424 (D), *L. plantarum* WCFS1Δ1425 (E) y *L. plantarum* WCFS1Δ1426 (F) y control del medio (A). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 30 °C en medio MRS conteniendo ácido *m*-cumárico a una concentración de 1,5 mM. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico; 3-HPPA, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico.

La **Figura 7** muestra además, que la interrupción del gen *lp_1422* afecta a la reducción del ácido *m*-cumárico. La proteína Lp_1422 es una proteína de 315 aminoácidos anotada como posible regulador transcripcional de la familia LysR. Los reguladores transcripcionales pertenecientes a esta familia son los más abundantes en procariotas. Éstos pueden actuar como activadores o represores de un único gen o de operones, y a menudo se suelen transcribir divergentemente de los genes que regulan (Maddocks y Oyston, 2008). Este es el caso del regulador Lp_1422, el cual se transcribe divergentemente a los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_1426*, cuya transcripción posiblemente regula. Los reguladores transcripcionales de la familia LysR generalmente poseen una estructura conservada la cual presenta un dominio N-terminal en donde se localiza un motivo hélice-giro-hélice de unión a ADN y un dominio C-terminal de unión a un co-inductor. Se ha descrito que la unión del co-inductor ocasiona un cambio conformacional en la estructura terciaria del regulador. Existen múltiples sitios de unión en la región intergénica entre el regulador y el gen u operón asociado. Generalmente, estos reguladores se unen desde la posición -35 a +20 pb del sitio de unión regulador (RBS, *regulatory binding site*) y desde la posición -40 a -20 pb del sitio de unión del activador (ABS, *activation binding site*). Los reguladores de la familia LysR se unen a una secuencia de ADN palindrómica. La afinidad por cada sitio de unión está determinada por el co-inductor, de manera que la forma “apo” de la proteína suele unirse únicamente al sitio RBS mientras que el sitio ABS sólo se ocupa una vez que el co-inductor se ha unido a la proteína. La curvatura del ADN es un factor importante en la interacción de estas proteínas, de manera que dos proteínas diméricas del regulador localizadas en los sitios RBS y ABS entran en contacto y como consecuencia directa de la curvatura del ADN, éstas forman una estructura tetramérica activa (Maddocks y Oyston, 2008). Esta estructura permite la formación de un complejo de orden superior que implica la ARN polimerasa, iniciándose así la transcripción. La presencia o ausencia de un co-inductor influye en el estado multimérico del regulador, de manera que éste experimenta un cambio conformacional cuando el co-inductor se inserta en el sitio de unión.

La posición de la región de unión con el regulador y la extensión de la curvatura parecen estar relacionados con el hecho de que el regulador actúe como activador o represor de la transcripción. El modelo clásico de un activador transcripcional de la familia LysR implica que el gen que codifica el regulador, en nuestro caso el gen *lp_1422*, se transcribe cuando la proteína Lp_1422 se disocia de su promotor. La proteína Lp_1422 se une *upstream* del promotor de los genes transcritos divergentemente (*lp_1424* a *lp_1426*). Cuando el co-inductor (ácido *m*-cumárico) interacciona con el regulador Lp_1422, se activa la transcripción de estos genes.

El hecho de que la interrupción del regulador Lp_1422 inhiba la posible actividad catalítica de las proteínas Lp_1424 y Lp_1425 indica que Lp_1422 es un activador transcripcional. De manera que se puede proponer un modelo para la regulación del operón (**Figura 8**). De manera similar a la mayoría de reguladores transcripcionales LysR, Lp_1422 regula el operón contiguo. Lp_1422 se expresa en una determinada cantidad bajo condiciones fisiológicas. De manera que se puede asumir que una mínima cantidad de Lp_1422 producida en condiciones fisiológicas normales es suficiente para reprimir su propia expresión posiblemente mediante su unión a una región *downstream* a su sitio de inicio de la transcripción. La presencia de ácido *m*-cumárico y su posterior unión a Lp_1422 hace que ésta se separe del ADN. Por consiguiente, la proteína Lp_1422 queda libre para su unión al ADN en una zona *upstream* al promotor de los genes *lp_1424-lp_1426* posiblemente debido a un cambio conformacional, lo que da lugar a la transcripción del operón *lp_1424-lp_1426*.

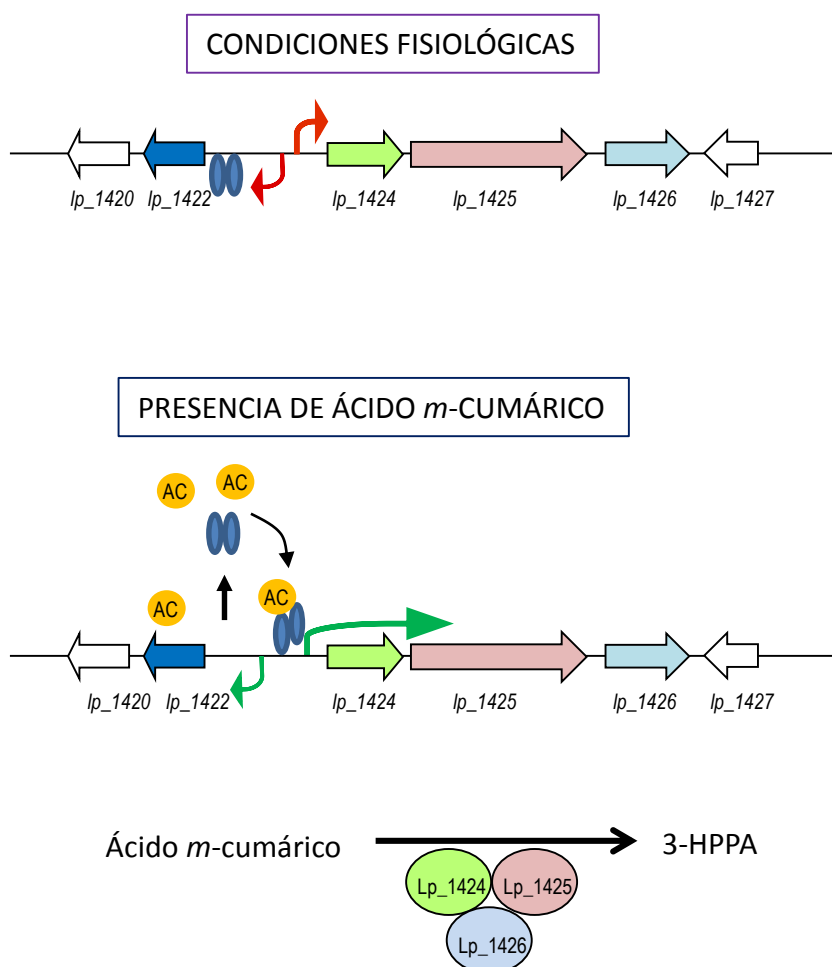


Figura 8. Modelo propuesto para el operón implicado en la reducción de ácido *m*-cumárico en *L. plantarum* WCFS1. Los genes (*lp_1420* a *lp_1427*) están representados por flechas. Las elipses alineadas o no alineadas (en azul oscuro) representan el regulador transcripcional Lp_1422 unido o no unido al co-inductor (ácido *m*-cumárico), respectivamente. La flecha el color verde o rojo representa el avance de la transcripción o el bloqueo del operón *lp_1424-lp_1426*, respectivamente. AC, ácido *m*-cumárico.

1.1.4. Estudio de la expresión de los genes *lp_1424* y *lp_1425* en presencia de ácido *m*-cumárico.

El estudio de los mutantes con genes interrumpidos revela que tanto la interrupción del gen *lp_1422*, posible activador transcripcional, como los genes *lp_1424* y *lp_1425* que codifican posibles reductasas, originan la pérdida de la capacidad de reducir ácidos hidroxicinámicos en *L. plantarum* WCFS1. Por otro

lado, el análisis transcripcional de esta región muestra que los genes *lp_1424* y *lp_1425* se transcriben juntos, formando un operón con *lp_1426*. Por ello, la interrupción del primer gen del operón (*lp_1424*) mediante la inserción de un plásmido podría generar efectos polares en la transcripción de los genes posteriores del operón, es decir, la interrupción podría afectar a la transcripción de los genes *lp_1425* y *lp_1426*. Con objeto de verificar si la interrupción del gen *lp_1424* ocasionaba también un efecto polar en la expresión del gen *lp_1425* se estudió la transcripción de estos genes en presencia de ácido *m*-cumárico.

A partir de cultivos de *L. plantarum* WCFS1, *L. plantarum* WCFS1Δ*1424* y *L. plantarum* WCFS1Δ*1425* crecidos en MRS e inducidos con ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 10 min, se extrajo el ARN celular. Una vez extraído se trató con la enzima DNAsa y posteriormente se sintetizó el ADNc mediante la enzima retrotranscriptasa. Se diseñaron los oligonucleótidos 1222+1223 y 1224+1225 que amplifican regiones internas de los genes *lp_1424* y *lp_1425* de 65 y 198 pb, respectivamente. Una vez validados los oligonucleótidos (ver el apartado 5.4.3 de Material y Métodos) se analizó mediante RT-qPCR el cambio en la expresión relativa de estos genes respecto al nivel de transcripción de los mismos utilizando ADNc obtenido a partir de cultivos en ausencia del ácido *m*-cumárico. Se utilizó como control endógeno el gen *ldhD* utilizado en estudios anteriores con compuestos fenólicos (Reverón *et al.*, 2012).

Como se observa en la **Figura 9**, los niveles de transcripción obtenidos en presencia de ácido *m*-cumárico en la cepa silvestre, *L. plantarum* WCFS1, son similares a los encontrados en el estudio de expresión global utilizando micromatrices de ADN. Durante el estudio transcriptómico los genes *lp_1424* y *lp_1425* mostraron incrementos en la expresión de 15,3 y 19,7 veces respectivamente (Reverón *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el mutante *L. plantarum* WCFS1Δ*1424* claramente demuestran que la interrupción del gen *lp_1424* ocasiona efectos polares en la transcripción del gen *lp_1425*, en el que se observa una pequeña expresión posiblemente debida a la presencia de un

promotor secundario. Este promotor puede ser el identificado *upstream lp_1425* mediante el programa utilizado para la búsqueda de posibles regiones promotoras. En este caso, se trataría de un promotor débil, cuya actividad se incrementa 2,3 veces en presencia de ácido *m*-cumárico.

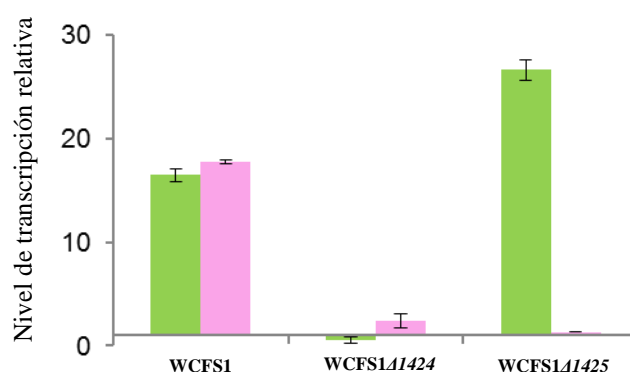


Figura 9. Análisis de la expresión relativa de los genes *lp_1424* y *lp_1425* en *L. plantarum* WCFS1 en las cepas mutantes *L. plantarum* WCFS1Δ1424 y *L. plantarum* WCFS1Δ1425 mediante RT-qPCR en presencia de 1,5 mM de ácido *p*-cumárico. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes. Las barras representan la transcripción relativa del gen *lp_1424* (verde) y *lp_1425* (rosa). Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otro lado, la **Figura 9** también muestra que en el mutante *L. plantarum* WCFS1Δ1425 ha desaparecido la inducción del gen *lp_1425* provocada por la presencia del ácido *m*-cumárico en la cepa silvestre. Estos resultados indican que la ausencia de la proteína Lp_1425 parece ser el único factor determinante de la falta de actividad reductasa que se observa en el mutante *L. plantarum* WCFS1Δ1425, debido a que este mutante posee un gen *lp_1424* funcional y por lo tanto la correspondiente proteína Lp_1424. Estos resultados indican que la proteína Lp_1425 es una proteína necesaria para la actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos en *L. plantarum*.

1.1.5. Clonación del gen y producción de la proteína Lp_1425

Los resultados obtenidos con los cultivos de las cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido *m*-cumárico, respecto a la ausencia de actividad reductasa y ausencia/presencia de expresión génica, revelaron que la proteína Lp_1425 es una proteína necesaria para la reducción del ácido *m*-cumárico. Por ello se decidió clonar el gen que la codifica, *lp_1425*, y comprobar la actividad bioquímica de la proteína tanto en extractos de *E. coli* como con la proteína pura.

Debido a que los plásmidos de la familia pURI se ha utilizado con éxito para la producción y purificación de proteínas recombinantes en *L. plantarum* (Esteban-Torres *et al.*, 2013, 2014a, 2014b, 2015, 2016; Guillén *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2014a, 2014b, 2014c) se diseñaron los oligonucleótidos 889 y 890 para amplificar el gen *lp_1425* (2.439 pb) añadiendo en sus extremos 5' nucleótidos capaces de hibridar con el vector de expresión pURI3-Cter utilizando una estrategia de clonación independiente de ligación (de las Rivas *et al.*, 2007). Con el plásmido recombinante pURI3-Cter-*l425* se transformó la cepa *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21(DE3) para la hiperproducción de la proteína Lp_1425 recombinante. Inicialmente, se cultivó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido recombinante pURI3-Cter-*l425* en medio LB. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,6 se indujo con 0,4 mM de IPTG. Después de probar distintas condiciones de inducción variando la temperatura y el tiempo se observó que en ninguna de ellas se hiperproducía la proteína Lp_1425. Por ello, se decidió producir la proteína en el vector pURI3, siendo la única diferencia respecto al vector pURI3-Cter que produce la proteína recombinante con una cola de 6 residuos de histidina en el extremo amino-terminal de la proteína en lugar de en el extremo carboxilo-terminal. Para clonar *lp_1425* en el vector pURI3 se utilizaron los oligonucleótidos 1791 y 1792. Con el plásmido recombinante pURI3-*l425* se transformó la cepa *E. coli* DH10B y posteriormente *E. coli*

BL21(DE3) para la hiperproducción de la proteína. De nuevo, al ensayar distintas condiciones de inducción se comprobó que aunque se producía la proteína Lp_1425, ésta aparecía como cuerpos de inclusión, no obteniéndose proteína en estado soluble. Para aumentar la solubilidad de la proteína producida y evitar la formación de cuerpos de inclusión se utilizó una variante del protocolo descrito por Ackerley *et al.* (2004). Las células se cultivaron a en medio LB conteniendo 1M de sorbitol, 2,5mM de betaína y 0,25 mM de IPTG durante cinco días a 22 °C. Utilizando estas condiciones de cultivo e inducción se comprobó que el extracto soluble de *E. coli* BL21 (DE3) transformado con el plásmido pURI3-Cter-1425 presentaba una proteína de aproximadamente 87 kDa ausente en el extracto procedente de *E. coli* BL21 (DE3). Con objeto de comprobar, de manera preliminar, la actividad reductasa de la proteína Lp_1425 recombinante, los extractos solubles obtenidos a partir de los cultivos de *E. coli* BL21(DE3) (pURI3) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) se incubaron directamente en presencia de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. La **Figura 10** muestra que, al contrario de lo que ocurre con los extractos de *E. coli* (pURI3), los extractos que contienen la proteína Lp_1425 hiperproducida son capaces de reducir todo el ácido *m*-cumárico presente. Como resultado de la actividad de Lp_1425 sobre el ácido *m*-cumárico se observa la producción de 3-HPPA.

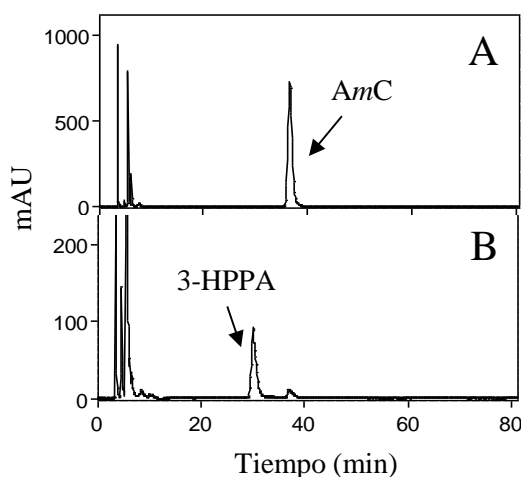


Figura 10. Reducción de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) mediante extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3) (A) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) (B). La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 37 °C durante 16 horas. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico; 3HPPA, 3 ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico.

A partir de los extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) que presentaban actividad reductasa, se purificó la proteína Lp_1425 recombinante en una única etapa. Se utilizó una cromatografía de afinidad a cobalto debido a la presencia de una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal de la proteína recombinante producida. La cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados permite una adsorción muy selectiva de la enzima recombinante (Armisen *et al.*, 1999). La proteína se eluyó de la resina mediante un gradiente de imidazol y posteriormente se dializó en 20 mM tampón fosfato sódico, pH 7 conteniendo 300 mM de NaCl para eliminar los restos de imidazol. Mediante el protocolo de hiperproducción y purificación descrito se obtuvieron 20 mg de proteína por litro de cultivo.

Una vez purificada la proteína Lp_1425, se realizó una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida para comprobar la hiperproducción de la enzima recombinante en los transformantes de *E. coli*. En la **Figura 11** se puede comprobar que, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-1425 como en las diferentes fracciones eluídas de la resina de afinidad con imidazol, aparece la proteína Lp_1425 recombinante con un tamaño aproximado de 87 kDa.

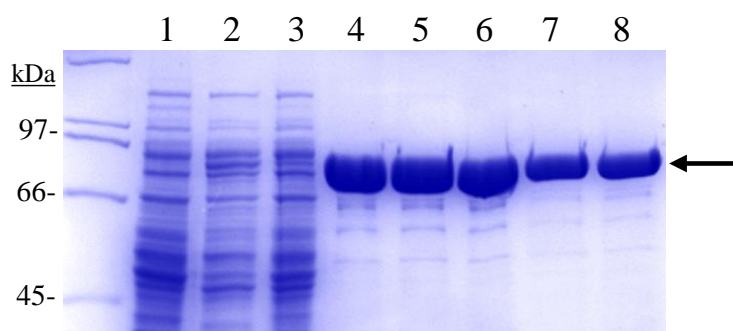


Figura 11. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_1425 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3) inducidas con IPTG; 2, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) inducidas con IPTG; 3, fracción eluida no retenida en la resina de afinidad; 4-8, fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

1.1.6. Actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos en la proteína Lp_1425

Una vez purificada y dializada la proteína Lp_1425 recombinante de *L. plantarum* WCFS1 se comprobó si ésta presentaba actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos. Esta proteína está anotada como “fumarato reductasa/succinato dehidrogenasa, flavoproteína de unión a FAD, FMN reductasa dependiente de NADPH”, debido a que presenta varios dominios, entre ellos un dominio de unión a FAD y otro de unión a FMN. La presencia de varios dominios diferentes con la existencia de cofactores asociados a ellos hace necesario que haya que añadirlos exógenamente para analizar la actividad enzimática de Lp_1425. Por ello se realizaron múltiples reacciones utilizando 10 o 100 µg de la proteína Lp_1425 pura. Se llevaron a cabo reacciones añadiendo 500 µM NADH sólo o añadiéndole 250 µM FAD, 250 µM FMN o ambos. De manera similar se realizaron reacciones equivalentes pero conteniendo 500 µM NADHP, en lugar de NADH, sólo o en combinación con 250 µM FAD y/o 250 µM FMN (Hertzberger *et al.*, 2014). Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7, en presencia de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Sorprendentemente, la proteína Lp_1425 pura no presentó actividad en ninguna de las condiciones ensayadas. La **Figura 12** muestra la reacción conteniendo 500 µM NADH, 250 µM FMN y 250 µM FAD.

Los resultados indicaban que durante el proceso de purificación y posterior diálisis de la proteína ésta se había inactivado o bien que la proteína pura necesita un cofactor adicional para su actividad *in vitro*.

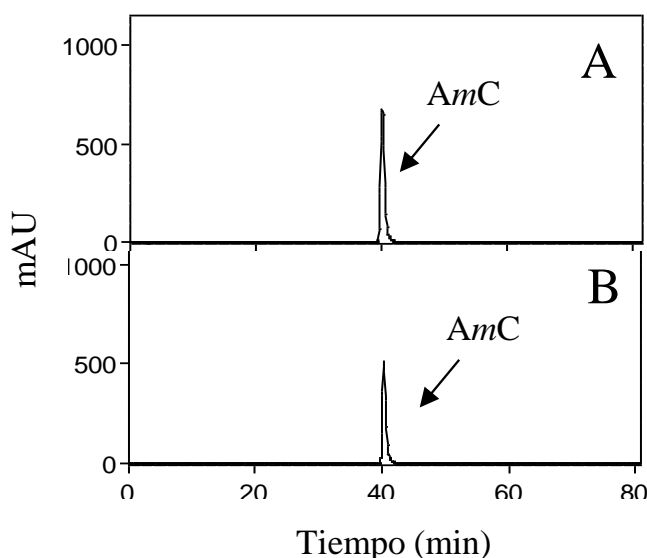


Figura 12. Reducción de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) mediante la proteína Lp_1425 recombinante pura. La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 conteniendo 500 μ M NADH, 250 μ M FMN y 250 μ M FAD, a 37°C durante 16 horas sin proteína Lp_1425 (A) o conteniendo 100 μ g de proteína Lp_1425 pura (B). UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico; 3-HPPA, 3 ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico.

Con objeto de comprobar posibles cambios producidos en la proteína durante su purificación y posterior diálisis, se realizó un análisis mediante SDS-PAGE de una alícuota de la proteína recién eluída y que había estado congelada durante una semana a -20 °C y de la proteína tras la diálisis, que fue la utilizada para el estudio de actividad reductasa *in vitro* (**Figura 13**). El gel SDS-PAGE muestra que la proteína congelada tras su elución presenta un incipiente patrón de degradación, con la aparición de una banda minoritaria de aproximadamente 55 kDa. Curiosamente, esta es la única banda que aparece tras la diálisis. Este resultado indica que la proteína Lp_1425 se hidroliza durante la diálisis y almacenamiento. Con objeto de evitar la hidrólisis de la proteína, se repitió la purificación y posterior diálisis en presencia de benzaminida 3mM como inhibidor de proteasas y añadiendo un 10% de glicerol, pero en un gel SDS-PAGE se observó de nuevo la proteólisis de Lp_1425.

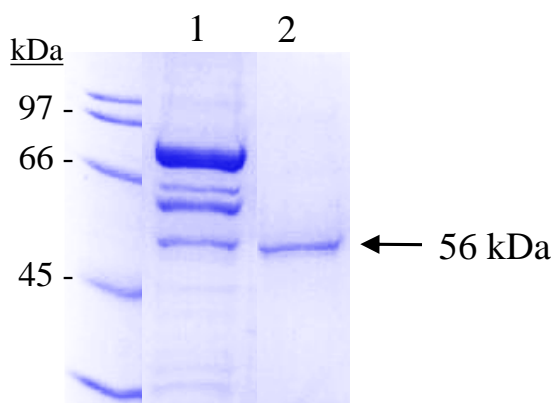


Figura 13. Análisis electroforético de la proteína Lp_1425 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, proteína congelada 7 días a -20°C tras su elución; 2, proteína dializada durante 16 h a 4°C tras su elución. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

La **Figura 13** sugiere que la degradación de la proteína Lp_1425 ocurre en un punto concreto originando una proteína de aproximadamente 55 kDa. Con objeto de identificar el péptido formado, la proteína pura tras la diálisis se sometió a espectrofotometría de masas y a un estudio de identificación por huella péptidica y fragmentación en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. El análisis de espectrometría de masas del fragmento de Lp_1425 revela que el péptido originado tiene un tamaño de 56.065 kDa. Por su lado, el análisis de huella péptida identifica con una probabilidad $p < 0,05$ una única proteína de *L. plantarum* WCFS1. La proteína identificada es gi/28378151 (Lp_1425) anotada como fumarato reductasa, precursor de la subunidad flavoproteína. Se identificaron 17 péptidos que englobaban el 23,5% de la proteína Lp_1425 (**Figura 14A**). Todos se localizan en el extremo C-terminal de la proteína. De hecho, se identificó el péptido IAAAHAVAEHVDPVTA que constituye el extremo C-terminal de la proteína Lp_1425 completa. Considerando el tamaño del péptido (56 kDa) y la localización de los fragmentos, se puede identificar el extremo N-terminal del fragmento hidrolizado en el aminoácido 289 de la proteína Lp_1425 completa, siendo su extremo N-terminal la secuencia “QVAQPAV” (**Figura 14B**).

A

Protein Summary Report

Format As Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 28378151	87235	430	fumarate reductase, flavoprotein subunit precursor [Lactobacillus plantarum WCFS1]

Results List

1. [gi|28378151](#) Mass: 87235 Score: 430 Expect: 1.1e-036 Matches: 17
fumarate reductase, flavoprotein subunit precursor [Lactobacillus plantarum WCFS1]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Start	End	Miss	Ions	Peptide
852.4321	851.4258	851.4137	14.2	702	708	0	---	K.TIADYNR.Y
930.5293	929.5210	929.5334	-13.37	452	459	0	---	K.WLQSIGVK.F
960.4848	959.4775	959.5076	-31.35	356	364	0	---	R.QFAALPGEK.Q
971.4524	970.4452	970.4508	-5.85	629	636	0	---	R.FVNEYGSR.D
1017.5444	1016.5371	1016.5403	-3.15	332	341	0	96	K.FYAVGNTVR.A
1035.5560	1034.5487	1034.5509	-2.10	416	424	0	69	R.IQTVLGGQR.T
1191.6459	1190.6387	1190.6448	-5.14	727	737	0	---	K.VAVAPFYATPR.K
1259.6783	1258.6710	1258.6670	3.21	405	415	0	---	K.GTLFDSTLLHR.I
1391.7851	1390.7778	1390.7932	-11.10	319	331	0	---	K.VLQAGHQAVVLEK.F
1406.6068	1405.5995	1405.6150	-11.01	709	720	0	---	R.YVDAGEDPEFHK.T
1483.7348	1482.7276	1482.7467	-12.91	783	796	0	83	R.LGGNSLSDIFTFGR.I
1485.6176	1484.6103	1484.6467	-24.47	342	355	0	---	R.AGGPMNAADPDWQR.Q
1501.6320	1500.6248	1500.6416	-11.20	342	355	0	---	R.AGGPMNAADPDWQR.Q + Oxidation (M)
1571.8012	1570.7939	1570.8103	-10.45	797	812	0	---	R.IAAAHVAEHVDPVTA.-
1735.8296	1734.8223	1734.8400	-10.17	460	474	0	---	K.FDESQVTMPVGAIWR.R
1751.8288	1750.8215	1750.8349	-7.64	460	474	0	---	K.FDESQVTMPVGAIWR.R + Oxidation (M)
1780.8410	1779.8337	1779.8275	3.49	369	383	1	---	K.DLSERDESTIAPEYR.A

No match to: 1449.3071, 1687.8372, 1712.8877

B

>YP_004889276.1 fumarate reductase/succinate dehydrogenase, FAD-binding flavoprotein; NADPH-dependent FMN reductase [Lactobacillus plantarum WCFS1]

MKFGVIGVTNAQHSYNRMLEFMQRHFATQAEIEIELELTDVPMFDESNDQTDSTIIQNFKIATADGVI
IASPEHNHVSVPALKSIIWLSEFKIHPLDGGQAVMIVGASYSVQGSRAQLHLRQILDAPGVNASVMPGSE
FLLGRAQTAFTDDQGNLKVQGTVDFLDSCFAKFKQKFATIVAEMRAPEALSFAFGTYQVTATGHNGELPMRV
TLSADRIENIEIDTSSETQGIADVAFERIPKEIIAGQTLAVDAISGASITSHGVIDGVARAVKEAGANPD
DLKKRRATKQVAPAVKEVTTDVVVVGAGGAGMTAAA**KVLQAGHQAVVLEKFPVAVGGNTVRAGGPMNAAD**
PDWQRQFAALPGEKQTLKDLSEERDESTIAPEYRADFRKLKQIDAYLTANTNQKGTFLDSTLLHRIQTYL
GGQRTDLNGQEIHGQYDLVKELTDNALDSV**KWLQSIGVKFDESQVTMPVGAIWR**RGHKPMGDLGFAYIKT
LRAFVEQQGGTIMTETPVKELLVTDGQVRGVIATNAAHEKVIVHADAVILASGGFAANTKMLQKYNTRYWT
AIDDDVKTNTSPAMTGDGIRLGTSGAALVGMGFSQMPVSDPETGELFSGLQVPPANFVMVNQQGK**RFV**
NEYGSRDELTQAAIDNGSLFYLIADDEIKKTAYNTTQAKIDQQVANGTLFRADTLTDLAQQIGMDPAALT
KTIADYNRYVDAGEDPEFHKTAFDLKVAVAPFYATPRKPATHTTMGGLKIDSDAHVLNTDQVIDGLYAA
GEVAGGIHAG**NRLGGNSLSDIFTFGR**IAAAHVAEHVDPVTA

Figura 14. Resultados de la búsqueda en Mascot del péptido originado en la hidrólisis de la proteína Lp₁₄₂₅. (A) La búsqueda identifica con mayor probabilidad a la proteína gi|28378151, anotada como fumarato reductasa, precursor de la subunidad flavoproteína de *L. plantarum* WCFS1 o Lp₁₄₂₅. El resultado de la búsqueda está expresado en $-10 \cdot \log(P)$ donde P es la probabilidad de que el resultado observado sea al azar. Los resultados mayores que 83 son significativos ($p < 0.05$). (B) Secuencia de aminoácidos de la proteína Lp₁₄₂₅. Los péptidos identificados por MALDI TOF/TOF se muestran con fondo azul. La línea roja señala el sitio de proteólisis de la proteína Lp₁₄₂₅.

Cuando se realiza un estudio de los dominios presentes en la proteína Lp_1425 se observa que desde su inicio hasta el aminoácido 175 se identifica el dominio conservado COG0431 (*conserved protein domain family SsuE*) de FMN reductasas dependientes de NAD(P)H (**Figura 15**). Posteriormente, desde el aminoácido 179 al 275 se identifica el dominio conservado COG3976 anotado como proteína no caracterizada que contiene un dominio de unión a FMN. Esta función asignada a este fragmento es sólo una predicción, no se ha demostrado ni funcional ni estructuralmente. De hecho, la mayoría de las proteínas anotadas como FMN reductasas carecen de este dominio que sólo se ha identificado en muy pocas proteínas hipotéticas de *Mesorhizobium loti*, *Treponema palidum* y *Clostridium acetobutylicum*. Continuando con el estudio de los dominios presentes en Lp_1425, por último, desde el aminoácido 321 al 797, se identifica el dominio COG1053 (*conserved protein domain family SdhA*) como la subunidad flavoproteína de las succinato deshidrogenasas/ fumarato reductasas. El punto de proteólisis de la proteína Lp_1425 se localizaría en el punto de unión de los dominios implicados en la actividad FMN reductasa y el dominio de unión al FAD de flavoproteínas. La **Figura 16** muestra un modelo propuesto para la estructura tridimensional modular de Lp_1425.

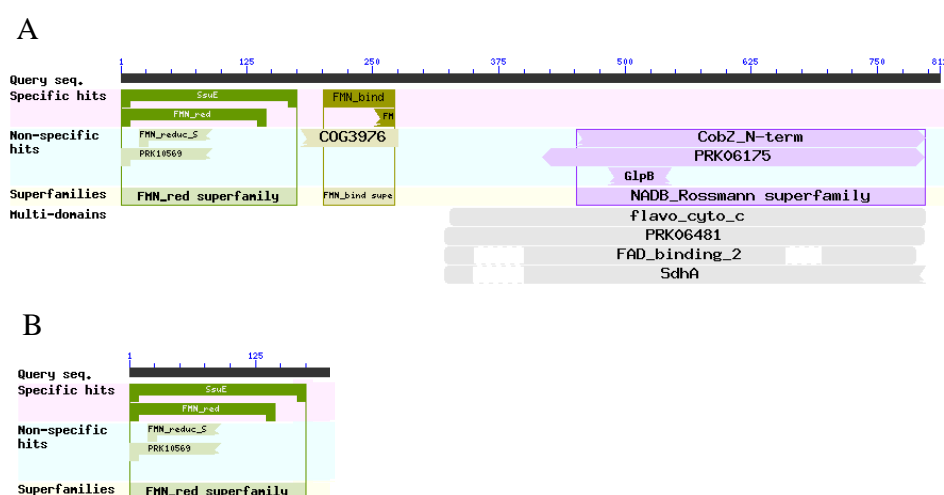


Figura 15. Identificación de dominios conservados en las proteínas Lp_1425 (A) y Lp_1424 (B). La búsqueda se realizó en la dirección <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. La línea negra superior representa la proteína desde su extremo N-terminal al C-terminal. La posición de los aminoácidos en las proteínas se señala cada 25 aminoácidos.

Resultados publicados con una flavoreductasa dependiente de NADH de *Lactobacillus johnsonii* apoyan el papel prescindible del fragmento situado entre los aminoácidos 179 y 275 de la proteína Lp_1425. Hertzberger *et al.* (2014) purificaron una flavoreductasa dependiente de NADH implicada en la producción de H₂O₂ en *L. johnsonii* la cual está codificada por dos genes contiguos y muy similares (*lj_0548* y *lj_0549*), que codifican proteínas de 20 kDa conteniendo dominios conservados de flavinreductasas. Las proteínas codificadas por los genes *lj_0548* y *lj_0549* poseen 178 y 184 aminoácidos que presentan un 42% de identidad entre ellas. De manera similar a lo que ocurre con los genes *lp_1424* y *lp_1425*, en la reducción de ácidos hidroxicinámicos, la interrupción de cada uno de los genes *lj_0548* y *lj_0549* en *L. johnsonii* ocasiona la pérdida de actividad reductasa lo que identifica a estos genes como responsables de la pérdida de actividad. La hiperexpresión de cada uno de estos genes de manera individual no ocasiona la producción de la correspondiente enzima recombinante. Sin embargo, cuando se hiperexpresan los dos genes simultáneamente, tal como se encuentran en el genoma de *L. johnsonii*, si se obtiene la hiperproducción de una proteína del tamaño esperado, sin poder determinar si se trata de Lj_0548 o de Lj_0549. Este resultado puede indicar que sólo se necesitaría esa proteína para obtener actividad. Sin embargo los resultados obtenidos en los estudios de complementación en la cepa con los dos genes delecionados (*lj_0548* y *lj_0549*) indican la necesidad de los dos genes para la actividad reductasa. Los autores concluyen que se necesitan los dos genes para obtener una enzima reductasa funcional, aunque se desconoce su composición exacta (Hertzberger *et al.*, 2014).

Posteriormente, Valladares *et al.* (2015) confirmaron que la hiperexpresión de Lj_0548 (FredB) aumentaba la solubilidad de Lj_0549 (FredA). Mediante cromatografía de exclusión molecular determinaron que Lj_0548 en solución se comportaba como un monómero, mientras que Lj_0549 se agregaba durante la cromatografía. Sin embargo, el perfil de elución cuando se hiperproducían las dos proteínas juntas correspondía con un heterodímero, lo que indica que se

requieren ambos monómeros para la obtención de una proteína soluble activa. Además, demostraron que se necesita la formación del heterodímero para la unión del cofactor FMN.

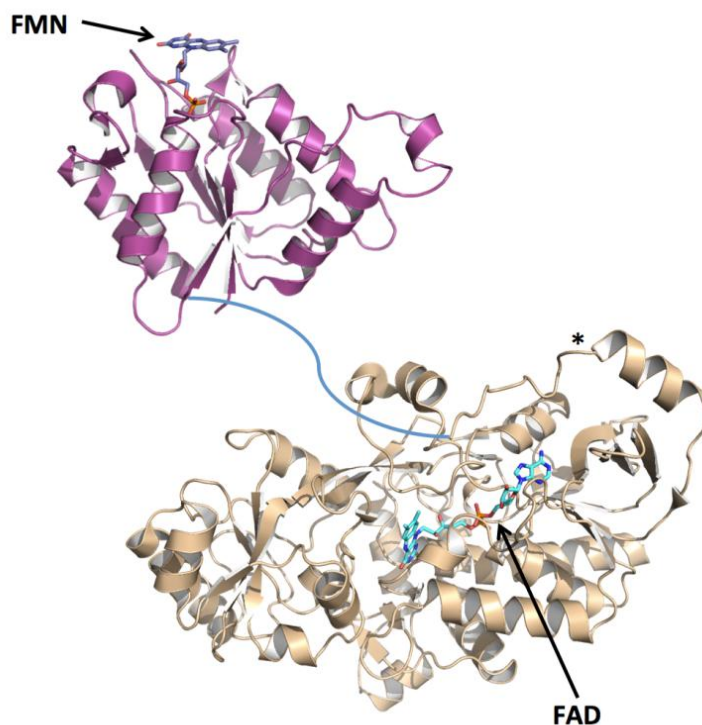


Figura 16. Modelo propuesto para la estructura tridimensional modular de Lp_1425. Se señala el módulo N-terminal de unión a FMN (color rosa) y el fragmento C-terminal de unión a FAD (color amarillo). Se muestran moléculas de FMN y FAD unidas. El asterisco señala el sitio donde tiene lugar la proteólisis de Lp_1425 (aminoácido 289). La figura se ha preparado con el programa PyMOL (DeLano, 2008) (<http://www.pymol.org>)

En ambos trabajos se analizó la presencia de genes consecutivos similares a *lj_0548* y *lj_0549* en otras especies. Aparte de las pertenecientes al grupo de *Lactobacillus acidophilus* (como *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* y *L. delbrueckii*) se encontraron genes similares en las especies *L. plantarum* WCFS1, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Atopobium parvulum*. En todas estas especies, el primero de los dos genes es similar en secuencia y tamaño a *lj_0548* o *lj_0549*, y están seguidos por un gen más largo, en el que los 200 aminoácidos del extremo N-terminal son similares a *lj_0548*. En todos estos casos, estos genes están anotados como fumarato reductasas, NADH deshidrogenasas o flavin reductasas (FMN reductasa dependiente de NAD(P)H aunque no hay ningún dato experimental que apoye estas anotaciones (Hertzberger *et al.*, 2014).

En el caso de *L. plantarum* WCFS1 hay tres parejas de genes que presentan el esquema descrito por Hertzberger *et al.* (2014), los genes *lp_1424* y *lp_1425*, *lp_2733* y *lp_2732*, y *lp_3492* y *lp_3491*. El alineamiento de la proteína Lp_1424 con los 204 aminoácidos del extremo N-terminal de Lp_1425 revela que existe un alto grado de identidad entre ellos (50%) (**Figura 17A**). Cuando en el alineamiento se incluyen las proteínas Lj_0548 y Lj_0549 se comprueba que presentan un alto grado de similitud hasta el aminoácido 175 de Lp_1425 que coincide con el dominio conservado COG0431 (*conserved protein domain family SsuE*) de FMN reductasas dependientes de NAD(P)H identificado en la búsqueda de dominios conservados en la proteína (**Figura 15 y 17B**).

A

```

Lp_1424      MKFVGIVGTNATKSTNRQLQYMQRHFQQQATIEICEIKDLPAFNEPEDRTAPVAIQQLS
Lp_1425      MKFVGIVGTNAQHSYNRMLLFQMQRHFATQAEIEILELTDVPMFDESNDQTDSTIIQNFA
              ***** : * ** ** : ***** ** ** ** : . : * * : * : * : . : **** :

Lp_1424      DKITAADGVIFATPEYDHSIPAVLKS AIEWLSYTTTRPLINKPVMIVGASNGSLGTSRAQA
Lp_1425      TKIATADGVIIASPEHNHNSVPSALKS IIEWLSFKIHPLDQAVMIVGASYSVQGSSRAQL
              * : : ***** : * : : : * : : . : ** ** : . : * : : ***** . : * : *****

Lp_1424      HLRQILEAPELKALVMPNIEYLLGRSLQAFDDQGDLYPDKVQELDNAGFGEFIDFVDLTN
Lp_1425      HLRQILDAPGVNASVMPGSEFLLGRAQTAFDDQGNLKVQGTVDFLDSCFAKFQKFATIVA
              ***** : * : * ** . * : ***** : ***** : * . . : * : * . : * . * . : .

Lp_1424      KIMPSSQFFEKSKQFSWRQVTGEE
Lp_1425      EMRAPEALSFAPGTYQV-TATGHN
              : : . : : . : . ** :

```

B

```

Lj_0549      MKLLAIVGTNADFSYNRFLDQFMAKRYKDQAEIEVYEIADLPRFKKEAQ--PDSKVVEEFK
Lj_0548      MKLFAIVGSNADHSYNRDLLNFIKKHFTDRYDIELGEVKDLPFMKEGVK--EPAVASFA
Lp_1424      MKFVGIVGTNATKSTNRQLQYMQRHFQQQATIEICEIKDLPAFNEPEDRTAPVAIQQLS
Lp_1425      MKFVGIVGTNAQHSYNRMLLFQMQRHFATQAEIEILELTDVPMFDESNDQTDSTIIQNFA
              * : . : * : * : * * * : : : : : * : * : * : * : * : . : : : :

Lj_0549      NKIREADGVIFATPEYDHGIPSALKS AEWGTGSHAQGNADVMMKMPAMVLGTSYGIQGAS
Lj_0548      KKVADADAVLISTPEQQHSVPSSLKSALEWLSSAEH----PFKDKPVVIVGTSVLPQGSA
Lp_1424      DKITAADGVIFATPEYDHSIPAVLKS AIEWLSYTTTR----PLINKPVMIVGASNGSLGTS
Lp_1425      TKIATADGVIIASPEHNHNSVPSALKS IIEWLSFKIH---PLDGQAVMIVGASYSVQGSS
              * : ** : * : : : * : : * : * : * : * : . : : : : : : : : : * : :

Lj_0549      RAQEEMREILLSPDQSANVLPGNEVLIGHAADKFDKNTGDLDDQETIHAIDLAFNNFVKF
Lj_0548      RGQSHLKLVLSSPGFGAKVFNGDEFMMGTAPEQFDEN-GNLP-AGTVKFLDHFFDEFDSF
Lp_1424      RAQAHLRQILEAPELKALVMPNIEYLLGRSLQAFDDQ-GDLYPDKVQELDNAGFGEFIDF
Lp_1425      RAQLHLRQILDAPGVNASVMPGSEFLLGRAQTAFDDQ-GNLKVQGTVDFLDSCFAKFQKF
              * . * . : : * : * * * : . * : * : * : * : * : * : . : . : * * : * : *

Lj_0549      VEQAQK-----
Lj_0548      YAEVSK-----
Lp_1424      VDLTNKIMPSSQFFEKSKQFSWRQVTGEE
Lp_1425      ATIVAEMRAPEALSFAPGTYQV-TATGHN
              . :

```

Figura 17. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína Lp_1424 y el extremo N-terminal de la proteína Lp_1425 de *L. plantarum* WCFS1 (A), y su comparación con las proteínas Lj_0548 (FRedB) y Lj_0549 (FRedA) de *L. johnsonii* (B). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa Clustal Omega. Se indica (*) identidad entre aminoácidos; (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo.

1.1.7. Producción de la proteína Lp_1424 y estudio de su actividad reductasa

Debido a las características comunes observadas entre Lp_1424/Lp-1425 y Lj_0548/Lj_0549 y la hidrólisis que experimenta la proteína Lp_1425 pura se decidió realizar un estudio similar al realizado en *L. johnsonii* por si la proteína Lp_1424 tuviese un papel determinante en la estabilidad de la proteína Lp_1425.

En primer lugar se clonó el gen *lp_1424* para comprobar si la proteína Lp_1424 presentaba actividad reductora sobre ácidos hidroxycinámicos. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos 1631 y 1632 para amplificar el gen (615 pb) añadiendo en sus extremos 5' nucleótidos que hibridan con el vector de expresión pURI3-Cter (de las Rivas *et al.*, 2007). Con el plásmido recombinante pURI3-Cter-*1424* se transformó inicialmente la cepa *E. coli* DH10B y posteriormente se transfirió a la cepa *E. coli* BL21(DE3) para la hiperproducción de la proteína Lp_1424 recombinante. Los cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido recombinante pURI3-Cter-*1424* en medio LB cuando alcanzaron una DO_{600nm} de 0,6 se indujeron con 0,4 mM de IPTG y se incubaron 18 h a 22 °C. Utilizando estas condiciones de cultivo e inducción se comprobó que el extracto soluble de *E. coli* BL21 (DE3) transformado con el plásmido pURI3-Cter-*1424* presentaba una proteína hiperproducida de aproximadamente 22 kDa ausente en el extracto procedente de *E. coli* BL21 (DE3). Con objeto de comprobar, de manera preliminar, la actividad reductasa de la proteína Lp_1424 recombinante, extractos proteicos solubles obtenidos a partir de los cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-*1424*) se incubaron directamente en presencia de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. La **Figura 18** muestra que los extractos que contienen la proteína Lp_1424 hiperproducida son incapaces de reducir el ácido *m*-cumárico

presente. Estos resultados confirman que la proteína Lp_1424 por si sola no posee actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos.

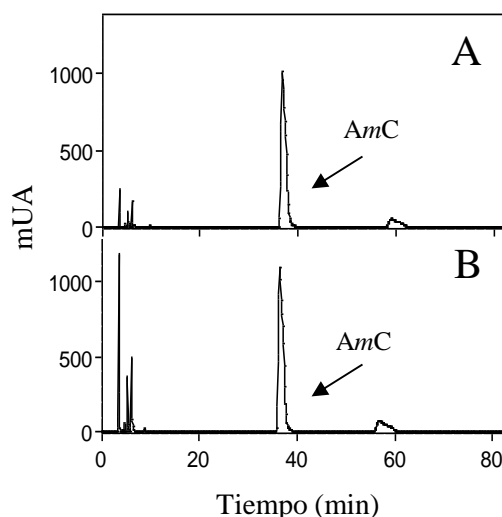


Figura 18. Reducción de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) mediante extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) (A) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424) (B). La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 37 °C durante 16 horas. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico.

La ausencia de actividad reductasa se confirmó con la proteína Lp_1424 pura. Para ello, la proteína recombinante se purificó a partir de extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424) en una única etapa. Para ello se utilizó una cromatografía de afinidad a cobalto debido a la presencia de una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal de la proteína recombinante producida. La proteína se eluyó mediante imidazol y se dializó. Mediante el protocolo de hiperproducción y purificación descrito se obtuvieron 30 mg de proteína Lp_1424 por litro de cultivo.

Mediante un gel de SDS-PAGE al 12,5 % de acrilamida se comprobó la hiperproducción y pureza de la enzima Lp_1424 recombinante en los transformantes de *E. coli*. En la **Figura 19** se puede comprobar que, tanto en el

extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-Cter-*L424* como en las fracciones eluídas de la resina aparece la proteína Lp_1424 con un tamaño aproximado de 22 kDa.

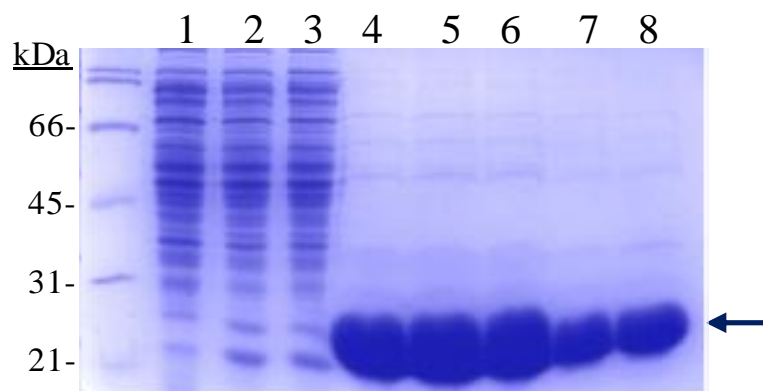


Figura 19. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_1424 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG; 2, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-*L424*) inducidas con IPTG; 3, fracción eluida no retenida en la resina de afinidad; 4-8, fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

La proteína Lp_1424 está anotada como “FMN reductasa dependiente de NADPH”, debido a que presenta un dominio de unión a FMN. Se realizaron múltiples reacciones utilizando 10 o 100 μ g de la proteína Lp_1424 pura y añadiendo 250 μ M FMN sólo o con 500 μ M NADH. Se realizaron reacciones equivalentes pero conteniendo 500 μ M NADHP, en lugar de NADH (Hertzberger *et al.*, 2014). Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7, en presencia de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Como era de esperar la

proteína Lp_1424 pura tampoco presentó actividad en ninguna de las condiciones ensayadas. La **Figura 20** muestra la reacción conteniendo 500 μ M NADH, 250 μ M FAD y 250 μ M FAD.

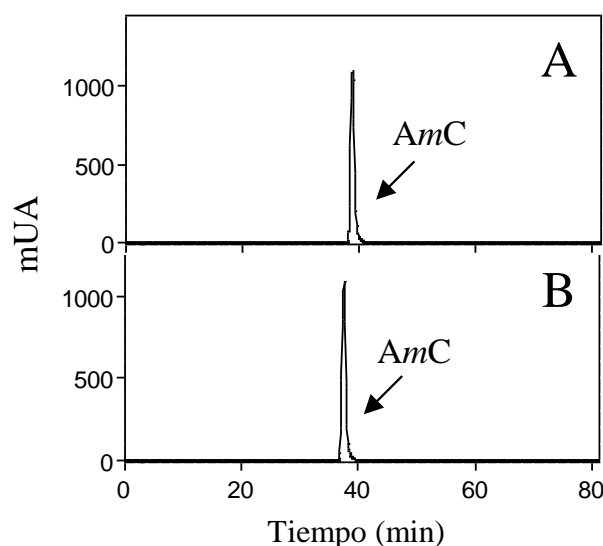


Figura 20. Reducción de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) mediante la proteína Lp_1424 recombinante pura. La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 conteniendo 500 μ M NADH y 250 μ M FMN, a 37 °C durante 16 horas sin proteína Lp_1424 (A) o conteniendo 100 μ g de proteína Lp_1424 pura (B). UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico.

Con objeto de conocer si para la reducción de ácido *m*-cumárico en *L. plantarum* WCFS1 era necesaria la actividad de las dos proteínas para obtener una enzima reductasa soluble, estable y funcional (como ocurre en la reductasa descrita previamente en *L. johnsonii* (Hertzberger *et al.*, 2014; Valladares *et al.*, 2015) se clonaron los genes *lp_1424* y *lp_1425* en el mismo vector. En *L. johnsonii* cuando se hiperproducen las dos proteínas juntas se forma un heterodímero que es el que constituye la proteína soluble activa. En *L. plantarum* WCFS1 para clonar ambos genes contiguos en el vector pURI3-Cter se utilizaron los oligonucleótidos 1631 y 890 que amplifican el gen *lp_1424*, las

dos bases que separan ambos genes y el gen *lp_1425*. A su vez, el oligonucleótido 890 confiere a la proteína Lp_1425 una cola de 6 residuos de histidina en su extremo C-terminal. No se utilizó el vector pURI3 para que la introducción de la cola de histidinas en el extremo N-terminal de Lp_1425 no afectase a la expresión conjunta de ambos genes. En el vector pURI3-Cter el extremo C-terminal de Lp_1424 y el extremo N-terminal de Lp_1425 aparecen de forma idéntica a cómo se encuentran en la cepa original *L. plantarum* WCFS1.

Siguiendo el protocolo habitual, con el plásmido recombinante pURI3-Cter-*1424+1425* se transformó la cepa *E. coli* DH10B y para la hiperproducción de las proteínas Lp_1424 y Lp_1425 recombinantes se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Cuando el cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido recombinante crecido en LB se indujo con 0,4 mM de IPTG y se incubó 18 h a 22 °C no producía proteínas solubles, por ello las células se cultivaron a 22 °C en medio LB conteniendo 1M de sorbitol y 2,5 mM de betaína e inducidas desde el principio de la incubación con 0,25 mM de IPTG durante cinco días (Ackerley *et al.*, 2004). Utilizando estas condiciones de cultivo e inducción se comprobó que el extracto soluble de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pURI3-Cter-*1424+1425* presentaba dos proteínas hiperproducidas de aproximadamente 87 y 22 kDa ausentes en el extracto procedente de *E. coli* BL21 (DE3) y correspondientes con las proteínas Lp_1425 y Lp_1424, respectivamente (**Figura 21**). Este resultado indicaba que la producción simultánea de las proteínas Lp_1424 y Lp_1425 hace que ésta última se hiperproduzca mejor en este vector.

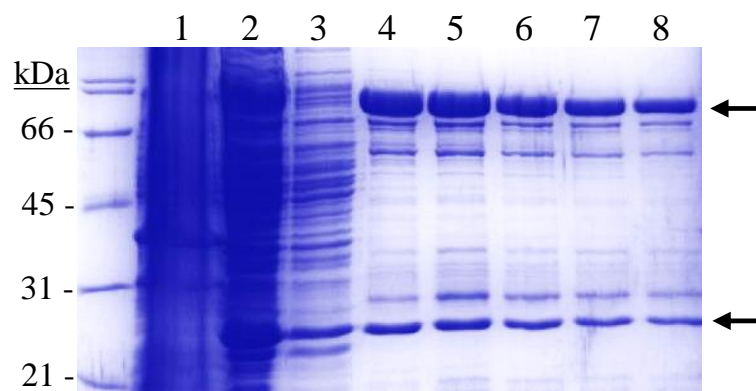


Figura 21. Hiperproducción y purificación de la proteínas Lp_1424 y Lp_1425 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG; 2, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1424+1425) inducidas con IPTG; 3, fracción eluida no retenida en la resina de afinidad; 4-8, fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Se comprobó la actividad reductasa de extractos solubles proteicos incubados en presencia de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Tal como era de esperar, la **Figura 22A** muestra que los extractos que contenían las proteínas Lp_1424 y Lp_1425 hiperproducidas reducían el ácido *m*-cumárico presente, al igual que ocurría cuando sólo estaba presente la proteína Lp_1425.

Con objeto de asignar un posible papel a la proteína Lp_1424 en la estabilidad de la proteína Lp_1425 durante su purificación, ambas proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos proteicos solubles *E. coli* conteniendo el plásmido pURI3-Cter-1424+1425. Mediante esta cromatografía de afinidad las proteínas que poseen una cola de residuos de histidinas quedan retenidas en la resina y posteriormente se eluyen mediante

imidazol. El plásmido pURI3-Cter-1425+1425 produce la proteína Lp_1425 con una cola de histidinas en su extremo C-terminal, sin embargo produce la proteína Lp_1424 en estado nativo, sin cola de histidinas. Por ello, era de esperar que, aunque la proteína Lp_1424 también resultaba hiperproducida mediante este plásmido, sólo la proteína Lp_1425 se quedase retenida en la resina, para ser posteriormente eluida mediante imidazol. Sin embargo, tal como muestra la **Figura 21**, cuando la proteína Lp_1425 se eluye con imidazol también se eluye la proteína Lp_1424. Esto sólo es posible si ambas proteínas interaccionan entre ellas. Por ello, se podría pensar en un escenario similar al descrito en la reductasa de *L. johnsonii* por Valladares *et al.* (2015) en el que cuando se hiperproducen las dos proteínas juntas se forma un heterodímero, indicando que se requieren ambas proteínas para la obtención de una proteína soluble activa.

Con las proteínas Lp_1424 y Lp_1425 producidas a partir del plásmido pURI3-Cter-1424+1425, purificadas mediante cromatografía de afinidad y eluidas en tampón fosfato 50 mM pH 7, se realizaron ensayos de actividad reductasa. Al igual que con la proteína Lp_1425 pura se realizaron múltiples reacciones añadiendo 500 μ M NADH sólo o añadiéndole 250 μ M FAD, 250 μ M FMN o ambos, y reacciones equivalentes pero conteniendo 500 μ M NADHP, en lugar de NADH, sólo o en combinación con 250 μ M FAD y/o 250 μ M FMN. Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7, en presencia de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Al igual que ocurría con la proteína Lp_1425 pura producida sola, cuando ésta se hiperproducía junto con Lp_1425 no presentaba actividad en ninguna de las condiciones ensayadas. La **Figura 22B** muestra la reacción conteniendo 500 μ M NADH, 250 μ M FAD y 250 μ M FAD.

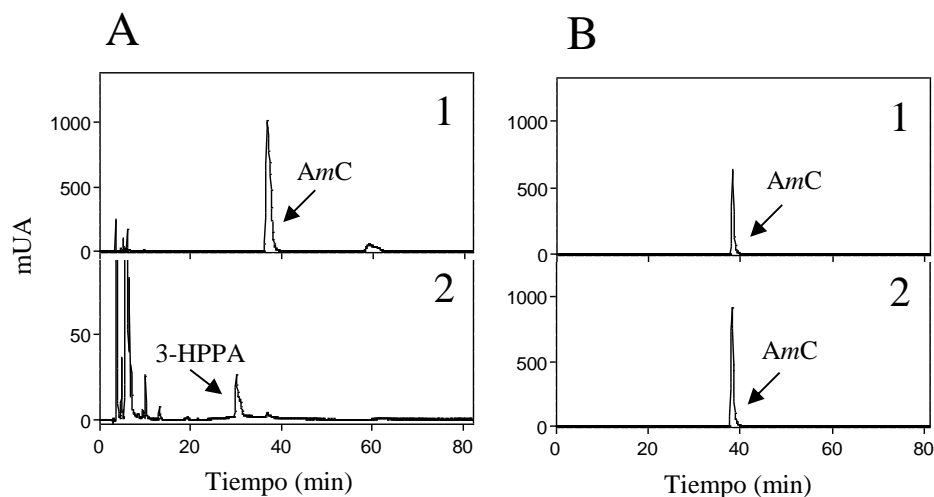


Figura 22. Reducción de ácido *m*-cumárico (1,5 mM) mediante las proteínas Lp_1424 y Lp_1425. A, mediante extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) (1) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424+1425) (2). La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 37 °C durante 16 horas. B, mediante proteínas recombinantes puras; la reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 conteniendo 500 μ M NADH y 250 μ M FMN, a 37 °C durante 16 horas sin proteínas (1) o conteniendo 100 μ g de las proteínas Lp_1424 y Lp_1425 puras (2). UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico; 3-HPPA, 3 ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico.

Puesto que en apartados anteriores se ha demostrado la proteólisis que ocurre en la proteína Lp_1425 durante su purificación y almacenamiento, se decidió observar el patrón mostrado por esta proteína cuando se produce sola o de manera simultánea a Lp_1424. Al comparar los extractos proteicos solubles, se observa que la producción de Lp_1424 aumenta la producción de Lp_1425 (**Figura 23A**). Además, la presencia de Lp_1424 reduce de manera importante la proteólisis experimentada por Lp_1425 durante su purificación (**Figura 23B**). Sin embargo, a pesar de la evidente reducción en la proteólisis de Lp_1425, los resultados indican que durante el proceso de purificación y posterior diálisis de

la proteína ésta se inactiva. Es posible que la proteína pura necesite además un cofactor desconocido para su actividad *in vitro*.

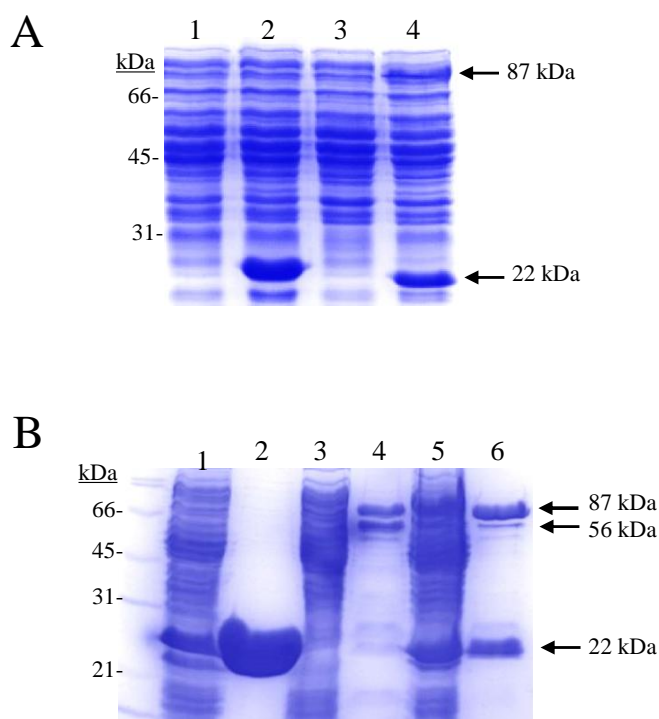
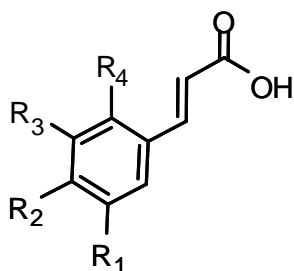


Figura 23. Hiperproducción de las proteínas recombinantes Lp_1424, Lp_1425, y Lp_1424 junto con Lp_1425. A, extractos proteicos solubles procedentes de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG (1), *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424) inducidas con IPTG (2), *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) inducidas con IPTG (3) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424+1425) (4). B, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424) inducidas con IPTG (1) y la correspondiente proteína Lp_1424 purificada y dializada (2); extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) inducidas con IPTG (3) y la correspondiente proteína Lp_1425 purificada y dializada (4); extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1424+1425) (5) y las correspondientes proteínas Lp_1424 y Lp_1425 purificadas y dializadas (6). Las proteínas Lp_1424 (22 kDa) y Lp_1425, completa (87 kDa) y proteolizada (56 kDa), se señalan con flechas. Gel SDS-PAGE 10 % de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

1.2. Identificación de sustratos de la reductasa Lp_1425

Los resultados anteriores demuestran que la proteína Lp_1425 es la reductasa responsable de la reducción del ácido *m*-cumárico a ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico (3-HPPA). También se ha demostrado que la proteína Lp_1424 no desempeña una función directa en la catálisis aunque parece que contribuye a la estabilidad de la proteína reductasa Lp_1425. Esta proteína se proteoliza fácilmente durante la purificación por lo tanto, para presentar actividad reductasa *in vitro*, podría requerir de condiciones especiales durante el proceso, o bien, la presencia de algún cofactor desconocido. Sin embargo, la proteína hiperproducida en extractos de *E. coli* mantiene su actividad y no necesita la presencia de ningún cofactor adicional.

Por ello, se estudió la actividad reductasa de la proteína Lp_1425 en extractos de *E. coli* que hiperproducían la proteína y se analizaron diversos ácidos hidroxicinámicos para conocer sus posibles sustratos. Cavin *et al.* (1997b) mediante la inactivación del gen que codifica la descarboxilasa PAD (Lp_3665) describieron que *L. plantarum* reducía los ácidos fenólicos a ácidos fenil propiónicos sustituidos convirtiendo los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico en los ácidos florético, hidroferúlico e hidrocafeico. Con objeto de comprobar si la proteína responsable de la reducción de ácido *m*-cumárico, Lp_1425, era también la responsable de la reducción de otros ácidos hidroxicinámicos, extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) que hiperproducen la proteína Lp_1425 se incubaron en presencia de otros ácidos fenólicos. Los ácidos ensayados fueron ácido *m*-cumárico (ácido 3-hidroxicinámico), ácido *o*-cumárico (ácido 2-hidroxicinámico), ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico), ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico), ácido sinápico (ácido 3, 5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) y ácido cinámico (**Figura 24**).



Ácido cinámico	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cafeíco	OH	OH	H	H
Cinámico	H	H	H	H
<i>m</i> -Cumárico	OH	H	H	H
<i>o</i> -Cumárico	H	H	H	OH
<i>p</i> -Cumárico	H	OH	H	H
Ferúlico	OCH ₃	OH	H	H
Sinápico	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

Figura 24. Representación esquemática de la estructura de los ácidos cinámicos utilizados en esta tesis.

Los resultados obtenidos demuestran que la proteína Lp₁₄₂₅ es la responsable de la reducción de todos los ácidos hidroxicinámicos ensayados (*m*-cumárico, *o*-cumárico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico) para originar ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico (3-HPPA), 3-(2-hidroxifenil) propiónico (2-HPPA), o ácido melilótico, 3-(4-hidroxifenil) propiónico o ácido florético, 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico o ácido hidrocafeico, 3-3-metoxi-(4-hidroxifenil) propiónico o ácido hidroferúlico o 3,5-dimetoxi-(4-hidroxifenil) propiónico o ácido hidrosinápico, respectivamente (**Figura 25**). Los compuestos obtenidos se identificaron mediante la comparación de su tiempo de retención y espectro de absorción, determinado mediante un detector de diodos, con el tiempo de retención y espectro del compuesto comercial (datos no mostrados).

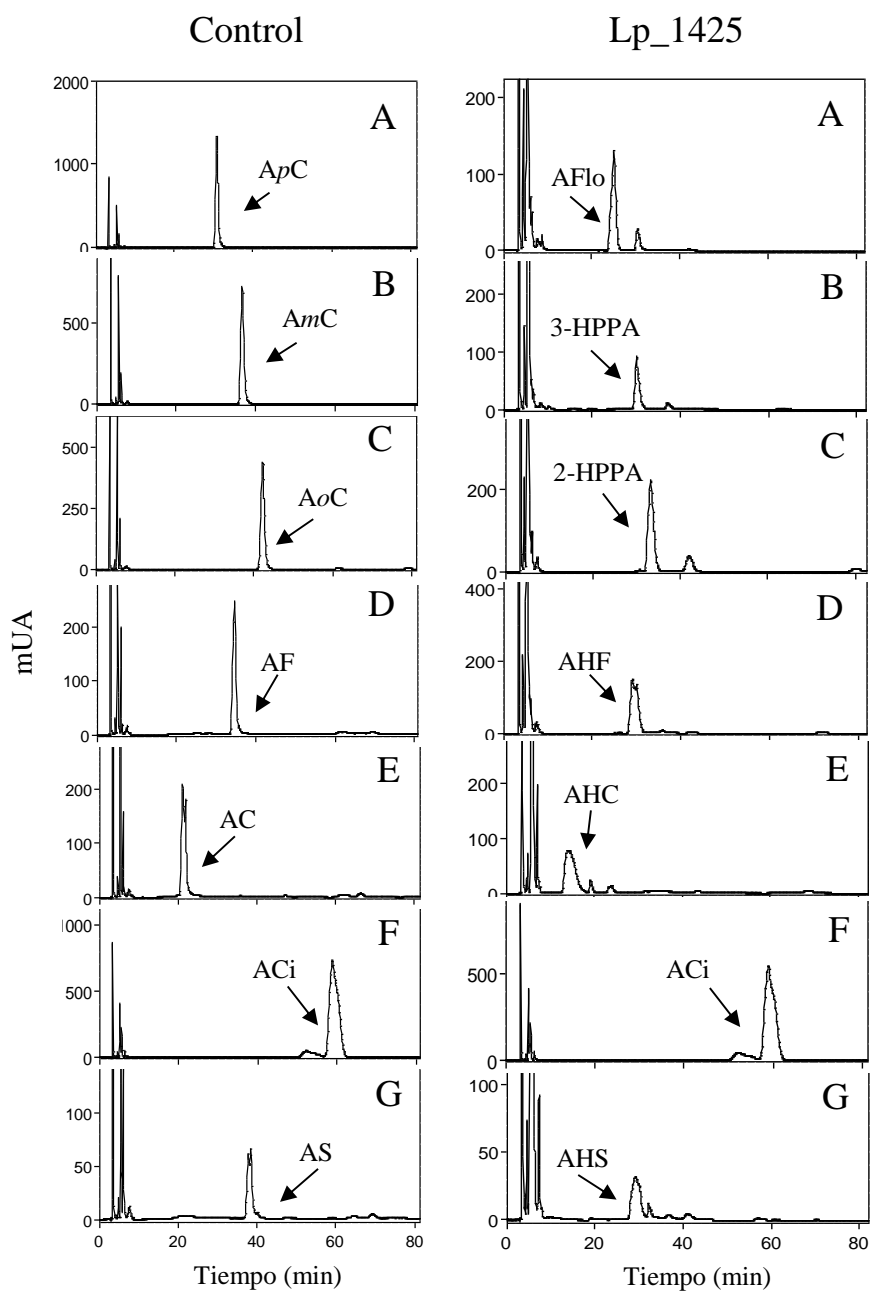


Figura 25. Reducción de ácidos cinámicos (1,5 mM) mediante extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3) (Control) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-1425) (Lp_1425). Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 37 °C durante 16 horas. Los ácidos analizados fueron ácido *p*-cumárico (A), ácido *m*-cumárico (B), ácido *o*-cumárico (C), ácido ferúlico (D), ácido cafeíco (E), ácido cinámico (F) y ácido sinápico (G). UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. ApC, ácido *p*-cumárico; AFlo, ácido florético; AmC, ácido *m*-cumárico; 3-HPPA, 3 ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico; AoC, ácido *o*-cumárico; 2-HPPA, 3 ácido 3-(2-hidroxifenil) propiónico; AF, ácido ferúlico; AHF, ácido hidroferúlico; AC, ácido cafeíco; AHC, ácido hidrocafeíco; ACi, ácido cinámico; AS, ácido sinápico; AHS, ácido hidrosinápico.

Hasta la realización de esta tesis no existía información genética sobre ninguna proteína con capacidad reductora de ácidos hidroxicinámicos. En 1964 se describió una actividad *o*-cumarato reductasa en extractos celulares de *Arthobacter* sp. Estos extractos fueron capaces de catalizar la reducción del ácido *o*-cumárico a ácido 3-(2-hidroxifenil) propiónico, también llamado ácido melilótico, en presencia de NADH (Levy, 1964; Levy y Weinstein, 1964). La actividad reductasa de *Arthrobacter* sp. fue muy específica con respecto a este ácido. Aparte de este trabajo no se ha purificado ninguna proteína bacteriana que presente actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos, ni tampoco se ha identificado el gen que la codifica. De la misma manera tampoco existía ninguna información, ni genética ni bioquímica, de la proteína de *L. plantarum* responsable de la reducción de estos ácidos. Se había descrito la presencia de esta actividad bioquímica en *L. plantarum* (Cavin *et al.*, 1997b) y en otras bacterias lácticas como *Lactobacillus curvatus* y *Weissella cibaria* aunque no se realizó ningún estudio sobre la enzima responsable (Filannino *et al.*, 2014). Por lo tanto, en esta tesis no sólo se ha identificado la enzima reductasa implicada en la reducción de ácidos hidroxicinámicos, sino que es la primera vez que se identifica una enzima con dicha actividad bioquímica.

1.3. Inducción de la actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos

Puesto que en apartados anteriores se ha descrito que el análisis transcripcional de la región donde se localiza el gen que codifica Lp_1425 revela que los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_1426* se transcriben juntos, y que el gen *lp_1422*, que codifica un posible regulador transcripcional, se transcribe divergentemente a ellos, se decidió estudiar la respuesta de estos cuatro genes a la presencia de los diferentes ácidos hidroxicinámicos estudiados. Para ello, se extrajo ARN de cultivos de *L. plantarum* WCFS1 incubados durante 10 min en presencia de 1,5 mM de cada uno de los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, *m*-cumárico, *o*-cumárico, ferúlico y sinápico), con el ácido cinámico, y con un ácido hidroxibenzoico (ácido gálico). El ARN extraído se trató con la enzima DNasa I

y posteriormente se sintetizó el correspondiente ADNc, mediante la enzima retrotranscriptasa. Se amplificaron regiones internas de los cuatro genes mediante los oligonucleótidos 1717+1718 (amplifican 61 pb de *lp_1422*), 1222+1223 (amplifican 65 pb de *lp_1424*), 1224+1225 (amplifican 198 pb de *lp_1425*) y 1226+1227 (amplifican 56 pb de *lp_1426*). Una vez validados los oligonucleótidos se analizó mediante RT-qPCR el cambio en la expresión relativa de los genes respecto al nivel de transcripción de los mismos utilizando el ADNc obtenido a partir de cultivos de *L. plantarum* incubados en ausencia de ácidos fenólicos.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de transcripción en los cultivos de *L. plantarum* incubados en presencia de ácidos hidroxicinámicos de los genes *lp_1424*, *lp_1425* y *lp_1426* son superiores a los obtenidos en ausencia de ácido (**Figura 23**). Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Curiosamente, estos genes también incrementaron su expresión de manera significativa en presencia del ácido cinámico, a pesar de no ser éste sustrato de la reductasa *Lp_1425*, posiblemente debido a la similitud en su estructura. Sin embargo, en presencia de un ácido hidroxibenzoico (ácido gálico) no se observa un aumento en la expresión de estos genes. Excepto, en presencia del ácido sinápico, la expresión del gen *lp_1422*, que codifica un activador transcripcional, no se vio alterada en presencia de ninguno de estos ácidos.

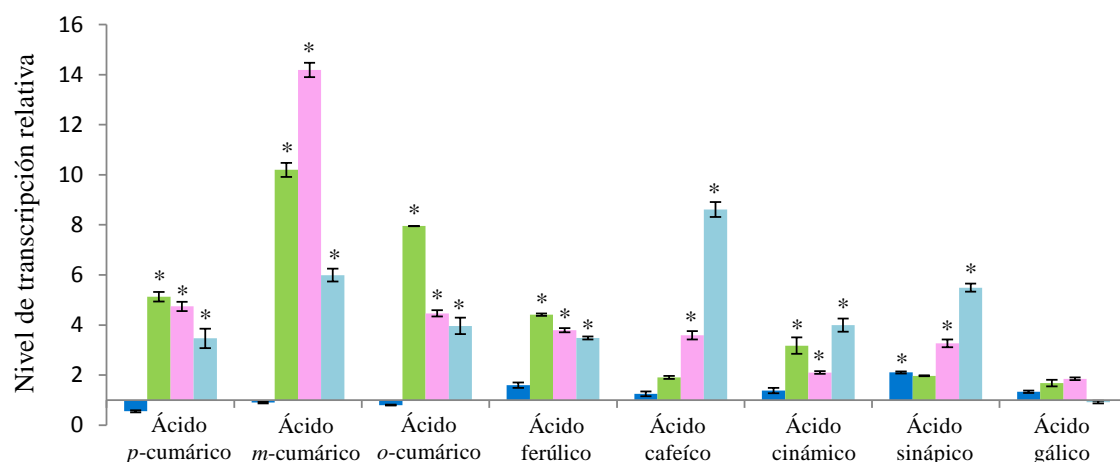


Figura 26. Análisis de la expresión relativa de los genes *lp_1422* a *lp_1426* en *L. plantarum* WCFS1 mediante RT-qPCR en presencia de 1,5 mM de distintos ácidos hidroxicinámicos. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes. Las barras representan la transcripción relativa de los genes *lp_1422* (azul oscuro), *lp_1424* (verde), *lp_1425* (rosa) y *lp_1426* (azul claro). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas en comparación con la muestra control sin tratar (test *t* de Student de dos colas, *, $p < 0,05$).

1.4. Actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos en otras bacterias lácticas

En apartados anteriores se ha demostrado que la proteína Lp_1425 de *L. plantarum* WCFS1 confiere actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos a *E. coli*. Estudios previos realizados en bacterias lácticas han demostrado que esta actividad enzimática es una actividad poco frecuente entre estas bacterias (Filannino *et al.*, 2014). Con objeto de conocer la presencia de proteínas similares a Lp_1425 en otras bacterias lácticas se realizó una búsqueda en las bases de datos. Dicha búsqueda reveló que sólo existían proteínas similares a Lp_1425 en un reducido número de especies de los géneros *Lactobacillus* (*L.*

plantarum, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. fabifermentans*, *L. alimentarius*, *L. paralimentarius* y *L. dextrinicus*), *Enterococcus* (*E. phoeniculicola*, *E. columbae*, *E. flavescens*, *E. casseliflavus* y *E. gilvus*), *Streptococcus* (*S. parasanguinis*, *S. uberis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* y *S. mutans*), y *Clostridium* (*C. beijerinckii* y *C. saccharobutylicum*). Todas estas especies poseían proteínas de 803 a 813 aminoácidos que presentaban alta identidad (62 a 97%) con la proteína Lp_1425 de *L. plantarum* WCFS1. El alto grado de similitud se situaba a lo largo de toda la proteína. Curiosamente, en la búsqueda también aparecían proteínas de otras especies de *Lactobacillus* como *L. gasseri*, *L. fermentum*, y *L. johnsonii*, pero que sólo presentaban alta identidad a partir del aminoácido 189 de Lp_1425. Es decir, estas proteínas carecían del dominio conservado COG0431 (*conserved protein domain family SsuE*) de FMN reductasas dependientes de NAD(P)H.

Con objeto de identificar posibles motivos conservados entre todas las proteínas de aprox. 800 aminoácidos identificadas en la búsqueda como similares a Lp_1425 se realizó un alineamiento de las mismas (**Figura 27**). El alineamiento permitió corroborar el alto grado de identidad entre ellas a lo largo de toda la proteína. Se identificaron numerosos motivos conservados de aminoácidos, y se seleccionaron dos dominios a partir de los cuales se diseñaron los oligonucleótidos degenerados 1655 (codifica QILDAPGV, posición 124 de Lp_1425) y 1656 (codifica GMGF(S/T)QMM, posición 598 de Lp_1425). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 1422 pb del gen que codifica Lp_1425.

```

CBE -----MKFIAIVGTSAKRSYNRKLQFMKKYFESKAEIEIEITDVPFMFNQSDNQS
CSA -----MKFIAIVGTSAKRSYNRKLQFMKKYFDLKAIEIEIEITDVPFMFNQSDNQS
SMU -----MKLIAIVGTNAKQSYNRILLQFMKRHFVQKADIDIMEIANVPMFNETEDQQT
SPA -----MKLVAIVGTNAKQSYNRSLQFMQRHFATKADIEIEIEITDVPFMFNQSDNQS
SUB -----MKFIGIIGTNAKKSYNRQLLSFMREHFASKAEIEVLEIDQVPMFNETNDQQT
SEQ MGSQLGGAFMLVAIVGTNAKKSYNRLLLQYMARHFAKQADIEIEIEITDVPFMFNQSDNQS
SGA -----MKLVAIVGTNAKKSYNRLLLQYMARHFAKQADIEIEIEITDVPFMFNQSDNQS
LPA -----MKFIGIVGTNAKKSYNRMLLQFMQKHFANKAEIEIELELKDVPFMFNQSDNQS
LAL -----MKFIGIVGTNAKKSYNRMLLQFMQKHFMDKAEIEIELELKDVPFMFNQSDNQS
LFA -----MKLVGIVGTNAKKSYNRELLEFIQRHFSQAEIEIELELTDVPLFNENDDQS
LPE -----MKFVGIVGTNARHSYNRMLLEFMRHFADQAEIEIELELTDVPMFDESNDQQT
LPL -----MKFVGIVGTNAQHSYNRMLLEFMRHFATQAEIEIELELTDVPMFDESNDQQT
LPP -----MKFVGIVGTNARHSYNRMLLEFMRHFATQAEIEIELELADVPFMFDESNDQQT
ECO -----MKFVAIVGTNAKKSYNRQLLLFMQEHFRPQVSIELLELNQVPLFNESEDQQT
LDE -----MKFIGIVGTNAEFSYNRLLLNYMQKHFAAEADLEIELEVTDVPMFNESDDQQT
EFL -----MKFVGLIGTNAKKSSTNRQLVAFMQREFAAALAEIELEIKDVPFMFNQSDNQS
ECA -----MKFVGLIGTNAKKSSTNRQLVAFMQREFAAALAEIELEIKDVPFMFNQSDNQS
EPH -----MKFVGIVGTNAKKSYNRMLLTFMQTHFSEQAEIELELTDVPMFNESDDQQS
EGI -----MKFVGIVGTNAKKSYNRKLKFMKKHFSKAEIDILELDKVPLFNESKQDS
          **:::***.*. * ** *: :: * .:::***: .**:*:::***:

```

```

CBE SSEVIQMFNNKITESDGVIIATPEYNHSIPSSLKSLIEWLSFDLHPLAGKPVMI LGASLD
CSA SSEVIQMFNDKITASDGVIIATPEYNHSIPSSLKSLIEWLSFDLHPLAGKPVMI LGASLD
SMU DLPAIQNFNTKISQADGVIIATPEHNHTIPSSLNSLIEWLSFKVHPLDGKPLMIVGASYD
SPA DTPVIQKFNQAISEADGVIIATPEHNHTIPSSLNSLIEWLSFNIHPLDGKPTMIVGASYD
SUB ESEIIQTFNRKISEADGVIIATPEHNHTIPSSALNSLIEWLSFKVHPLTGKPVMI VGASYS
SEQ ESAVIQNFNTKITEADGVIIATPEHNHTIPSSLNSLIEWLSFNIHPLTGKPVMI VGASYS
SGA ESIIQEFNSKITEADGVIIATPEHNHTIPSSLNSLIEWLSFNIHPLAGKPTMIVGASYD
LPA DSPIIQEFNQKIAASDGVIIATPEHNHSIPAALKSIEWLSFNLHPLDGKAVMI VGASYN
LAL KSEIIQEFNQKIEASDGVIIATPEHNHSIPAALKSIEWLSFNLHPLDGKPVMI VGASYS
LFA QSPVIQAFNEKITAADGVIIATPEHNHSVPSALKSIEWLSFKLHPLDGKPVMI VGASYS
LPE DSDVIQQFATKIEAADGVIIASPEHNHSIPSALKSIEWLSFKIHPPFDGQAVMI VGASYS
LPL DSTIIQNFATKIATADGVIIASPEHNHSVPSALKSIEWLSFKIHPLDGQAVMI VGASYS
LPP DSTVIQKFAKIAAADGVIIASPEHNHSVPSALKSIEWLSFKIHPLDGQAVMI VGASYS
ECO NSPIIQYFNTAITQADGVIIATPEHNHSIPSALKSILEWLSFKIHPLDGKPVMI VGASYS
LDE NSPIIQFNDKITAADGVIIATPEHNHSIPSALKSVLEWLSFNLHPPFDGKPTMIVGASLS
EFL NSEVIQRLNSKILAADGVIIATPEHNHSIPSALKSVLEWLSFNLHPPFDGKPVMI VGASYS
ECA NSEVIQRLNSKILAADGVIIATPEHNHSIPSALKSVLEWLSFNLHPPFDGKPVMI VGASYS
EPH DTPIIQSFNQKIMEADGVIIATPEHNHSIPSALKSILEWLSFNLHPPFDGKPVMI VGASYS
EGI ESPIIQLFNTKILEADGVIIATPEHNHSIPSSLKSILEWLSFNLHPPFDGKPVMI VGASYS
          . ** : * :*****::**:*::**:*::**:*::*****:***: * : *::*** .

```

1655

```

CBE VQGSSRAQLHLRQILDAPGV DANVMPGYEFLGSAHKAFDEEGLNNERTIDFLEICFLR
CSA SQGSSRAQLHLRQILDAPGV DANVMPGYEFLGSANKAFDEEGLNNERTIDFLEICFLR
SMU VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NAAVMPGSEFLLGRAHQAFDEAGNLKSEATVDFLESCFFK
SPA VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NATVMPGSEFLLGRAHRAFDENGDLIDERTVDFLDSCFYR
SUB EQGSSRAQLHLRQILDAPGV NAMVMPGSEFLLGNVHKAFDEAGHLKDLRTIDFLDSCFFR
SEQ IQGSSRAQLHLRQILDAPGV NAAVMPGSEFLLGLAHQAFDENGDLKGQGTIDFLESCFFR
SGA IQGSSRAQLHLRQILDAPGV NATVMPGSEFLLGRVQTAFDENGDLKDQGTIDFLESCFFR
LPA IQGSSRAQLHLRQILDAPGV NASVMPGSEFLLGKAQDAFDDKGNLKAQRTIDFLDSCFAK
LAL IQGSSRAQLHLRQILDAPGV NASVMPGSEFLLGRAQAFDENGNLNERTISFLDSCFAK
LFA VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NASVMPGSEFLLGRAQTAFDQGNLKESGTVAFLDSCFAK
LPE VQGSSRAQLHLRQVLDAPGV NASVMPGSEFLLGRAQTAFDQGNLKVQGTIDFLDSCFAK
LPL VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NASVMPGSEFLLGRAQTAFDQGNLKVQGTVDFLDSCFAK
LPP VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NASVMPGSEFLLGRAQTAFDQGNLKVQGTVDFLDSCFAK
ECO VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NATVMPGNEFLLGRAHEAFDENGHLKDERTIDFLESCFRK
LDE DQGSSRAQLHLRQILDAPGV NAAVMPGNEFLLGNVQLAFDDEGLNKDQGTIDFLETFCFSR
EFL VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NATVMPGNEFLLGRAHQAFDEQGNLKDQRTVDFLDSCFRK
ECA VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NATVMPGNEFLLGRAHQAFDEQGNLKDQRTIDFLESCFRK
EPH VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NATVMPGSEFLLGRANHAFADENGNLKEERTIDFLESCFWR
EGI VQGSSRAQLHLRQILDAPGV NASVMPGYEFLGCAHQAFDKEGNLQKERTIDFLESCFLR
          *****:*****.* ***** .: ***.*.* * : ** : ** :

```

CBE FMRFAKISNQLNEEEFTFNPGVYEVDAIGHSGSLPMKVSFSENRIESIDINIDGETEGL
 CSA FMRFAKISNQLNEEEFTFKPGVYEVSAIGHSGSLPMKVSFSEDRIESIDINTDGETEGL
 SMU FLRFVQVANQLNEPEEVSFEAGTYQVTTQGHNGKLPMTVTLSEKIEKIDIDSSGESSGI
 SPA FLRFVSVANQLNLPEEIRFEPGTYHVTTEGHNGKLPMDVTVSEDRIEKIEIDSSGESSGI
 SUB FLRFVTIANQLNQPEDIVFEPGIYTVTTPGHNGDLPMSVTFSDRIEKIDIDSSGETGGI
 SEQ FVRFATIANQLNEPEDVRFEPGTYQVTTVGHNGELPMSVTLSEERIEAIDIDSSGETGGI
 SGA FLRFATIANQLNEPEEVRFEFGTYQVTTVGHNGDLPMSVTLSEERIEAIDIDSSGETGGI
 LPA FMKFSDIIAQMNIPEDITYEPGTFKVTAVGHNGDLPMEVTLSDRIEKIDIDTSSETQGI
 LAL FMKFADIIAQMNIPEDISYTPGTFKVTAVGHNGDLPMEVTLSDRIEKIDIDTSSETQGI
 LFA FMKFDDLNVAMNVPDAVSYPGTYAVTAVGHNGKLPMSVTLSDRIEDIQIDTSTETKGI
 LPE FQKFAEIVAEMNAPEALSFPNGTYEVTATGHNGELPMRVTLSDRIEDIEIDTSSETKGI
 LPL FQKFATIVAEMRAPEALSFPNGTYQVTATGHNGELPMRVTLSDRIENIEIDTSSETQGI
 LPP FQKFATIVAEMRAPEALSFPNGTYQVTATGHNGELPMRVTLSDRIENIEIDTSSETQGI
 ECO FMRFTKVANLLNEPEELVLTPEGEYEVKTIGHNGDLPKVVLSIEDRIEQIDIDTSSETQGI
 LDE FMRFTKISNLLNIPPEEITFTPGTFDVTTPGHNGDLPKVVTLSEKIEKIDIDTSKETEGI
 EFL FVRFTEVANLLNPPEEVVYEPGEYTVTAPGHNGDLPVVKLSEERIEAIDIDTSSESEGI
 ECA FVRFTEVANLLNPPEEVVYEPGEYTVTALGHNGDLPVVKLSEERIEAIDIDTSSESEGI
 EPH FLRFTEVANLLNKPEEVHFSGAFTVTAPGHNGDLPVVTLSEKIEEIEIDTSSESEGI
 EGI FMRFTEVANLLNPPEEVVFEFGAYTVAAGHNGDLPVVSLNNRIEAIDIDTSSESEGI
 * : * : : . : . * : * : * . * . * * * . * . : * * * : * : * : *

CBE ADVVFVRIPDKIEGQTLNVDALSGASETSNAVLGDGAVAKVLAGVNPDLKRRPKPASS
 CSA ADVVFVRIPDKIEGQTLNVDALSGASETSNAVLGDGAVAKVLAGVNPDLKRRPKPASS
 SMU ADIVFTRIPNEIEGQTLNVDASVSGASVTSNGVLDGVARAIKLAGGNPDVLRKRPKAPSA
 SPA ADVVFTRIPAEIEGQTLNVDASVSGASVTSNGVLDGVARAVKQAGANPDVLRKRSKAPSA
 SUB ADIVFTRIPNEIEGQTLNVDVTSVSGASVTSNGVLDGVARAVKKAGANPEVLRSRPKAPSA
 SEQ ADVVFTRIPNEIEGQTLNVDASVSGASVTSNGVLDGVARAVRQAGANPDALRSRPKAPSA
 SGA ADVVFTRIPSEIEGQTLNVDASVSGASVTSNGVLDGVARAVRQAGANPDALRSRPKAPSA
 LPA ADVAFKRIPQIIEGQTLNVDVSGASITSRGVVDGAVAKVMAGANPDILKRRKKSNGP
 LAL ADVAFKRVPQIIEGQTLNVDVSGASITSNGVIDGAVAKVLAGANPDDLKRRKRASGP
 LFA AEVAFKRIPKAIIEGQTLAVDASVSGASMTSHGVIDGVAEAVKAAGANPDDLKRRQAQMTK
 LPE ADVAFERIPKEIIEGQTLAVDAISGASITSNGVIDGVARAVKEAGANPDELKRRATKAV
 LPL ADVAFERIPKEIIEGQTLAVDAISGASITSNGVIDGVARAVKEAGANPDDLKRRATKQV
 LPP ADVAFERIPKEIIEGQTLAVDAISGASITSNGVIDGVARAVKEAGANPDDLKRRATKQV
 ECO ADIVFTRIPPEIEIAGQTLNVDLISGASITSNGVLDGVAKAIKLAGGNPDILKRRKAKVQ--
 LDE ADVVFERIPQIIEGQTLNVDVSGASITSNGVIDGVAQAVKMAGVNPDLRQRPKAGAL
 EFL ADVVFVRIPQIIEGQTLNVDASVSGASVTSNGVVDGAVAKVMAGANPDVLRKRPKAASA
 ECA ADVVFVRIPQIIEGQTLNVDASVSGASVTSNGVVDGAVAKVMAGANPDVLRKRPKAASA
 EPH ADVVFTRIPKQIIEGQTLNIDVLSGASVTSNGVIDGAVAKVMAGANPDVLRKRPKAPSA
 EGI ADVVFTRIPSQIIEGQTLNVDVLSGASVTSNGVINGVAKAVKAAGANPDILKRRKAKAPSA
 * : . * * : * : * * * : * : * * * * . * : * * * * : * * * * : * : *

CBE LIKEDEEYTCDVVVVGAGGAGLSAAATALQNGKSAIVLEKYPAVGGNTIRSGGPINAADP
 CSA LIKEDEEYTCDVVVVGAGGAGLSAAATALQNGSSAIVLEKYPAVGGNTIRSGGPINAADP
 SMU LDKEDKTYSTDVIVVGAGGAGLAAAARVLQAGKQVMVLEKFPALGGNTVRSGLLNAADP
 SPA LDKEDKTYQADVIVVGAGGAGLAAAARVLQAGKKPIVVEKFPALGGNTVRSGLLNAADP
 SUB LDKEDKSYEADLVVVVGAGGAGLAAAARALQAGKKVIVLEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 SEQ LDKEDKTYDTELIVVGAGGAGLTAARALQAGKKVILVEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 SGA LDKEDRTYDTELVVVGAGGAGLAAAARALQAGKKVVVVEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 LPA NKQNVVEYQTDVVVGAGGAGLTAARTIQGKKAIVLEKFPALGGNTVRSGLLNAADP
 LAL NKQNVIEYNTDVAVVGAGGAGLTAARTIQGKKAIVLEKFPALGGNTVRSGLLNAADP
 LFA AVQNTDITTDVVVGAGGAGLTAARKVLQAGRNVLVVEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 LPE AKPKVTEVTTDVVVVGAGGAGLTAARKVLQAGHQAALVLEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 LPL AQPAVKEVTTDVVVVGAGGAGMTAAAKVLQAGHQAALVLEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 LPP VQSAVKEVTTDVVVVGAGGAGLTAARKVLQAGHQAALVLEKFPVGGNTVRSGLLNAADP
 ECO YDTSDELTTDVVIIGGGAGLSAAACVLQAGKQAIIVVEKYPAIGGNTVRTGGPMNAADP
 LDE QAIPDEEYTTDVIVVGAGGAGLTAARKTLQEGKQPIVVEKFPALGGNTVRSGLLNAADP
 EFL LQTEDEYTTDVVVVGAGGAGLSAAASVLQANKDVILVEKFPALGGNTVRTGGPMNAADP
 ECA LQTEDEYTTDVVVVGAGGAGLTAASKVLQEGKKTIVVEKFPVGGNTVRTGGPMNAADP
 EPH LKKEDEEYTTDVVVVGAGGAGLTAASKVLQEGKKTIVVEKFPVGGNTVRTGGPMNAADP
 EGI TDTKDRDYETDVVVVGAGGAGLAAAASILQEGKKVIVVEKFPVGGNTVRTGGPMNAADP
 : : : : * . * * * : : * : * . . : : * * : : * * * : * * * : * * *

```

CBE      EWQMQFEENKGERHTIEELLDTDES LIHPEYIDDFRALRKEFSEYKKKFETQKGHLFDSF
CSA      EWQIKFEENKGERHTIEELLDTDES LVHPEYIDDFRALRKEFSEYKKKFETQKGHLFDSF
SMU      EWQKTFPANPGEAHNLSELIQTDEDSIAAEYLADFKELKQQVTNYLKD----PSYLFDSN
SPA      AWQGTFEAHNPGEANTLQELIAIDESTIDPEYLEDFRALKVEVEQYLQD----PSYLFDSF
SUB      KWQNSFAANPGEDHNLQELKNMDESQIDPEFLEDFRALKQELEEYLNK----PTYLFDSN
SEQ      AWQNTFAANPGEAHNLQELHLDIDEATIDPEFLPDFRALKVEIEEYLNK----PTYLFDSK
SGA      AWQNTFAANPGEANTLQELHLDIDEATIDPEFIDDFRALKVEIEEYLNK----STYLFDSK
LPA      EWQNKFEEITGERHTLKEISEIDEKTIDAEYLADFKALKKKQINEYLNKENEDQKAYLFDSK
LAL      KWQNKFEEIPGERHTLKEITEIDEETIDQEYLTDFRALKKQINEYLNKENEDKKAYLFDSK
LFA      EWQHQFEAIPGEKHTLTETITQIDEATIAP EYLADFRVLKTQINAYLNKENKDQRGYLFDSF
LPE      DWQRQFAALPGEKKS LQELTELDEAQIAP EYRADFR TLKQQIKTYLADNADQGTGLFDSF
LPL      DWQRQFAALPGEKQTLKDLSE RDESTIAP EYRADFR LKQQIDAYLTANTNQKGLFDSF
LPP      DWQRQFAALPGEKQTLKDLSE RDESTIAP EYRADFR LKQQIEAYLTANTNQGLFDSF
ECO      TWQNQFAALPGEAHTLKEVLAMDENSIDNEYKADFKALKQAQINAYLSEQENGKDYLFDSF
LDE      EWQKQFPAIPGESHTLQEIIVAMPDESIDAEYRPD FLALRDQLQTYLAENTDENSYLFDSF
EFL      KWQNGFSALPGRSAL EEVLTIDEQEIDA EYLPDFKALKQAQITAYLSETTPEKEYLFDSA
ECA      KWQNGFSALPGRSAL EEVLTIDEQDIDA EYLPDFKALKQAQITAYLSETTPEKEYLFDSA
EPH      NWQRGFSALPGESHTL KEMIEMDEEQIDPDYRSDFRALKEEITAYLADNSAHEGYLFDSK
EGI      EWQSTFEAISGESHTLKEIVAIKEETIDPEYLEDFRALKHQITLYLEETT KTKGYLFDSF

```

[illegible]

```

CBE      LWRRGHKPTKSHGSSFILALTKYVQDNSGKIITDSPVKEFIIEDGEIKGVIATGVNGQKI
CSA      LWRRGHKPTKSHGSSFILALTKYVQDNSGKIITDSPVKEFIIEDGEIKGVIATGVNGQKI
SMU      LWRRSHKPKQPMGYAFIEALDITYIRKNSGTILTDTAVTDFILENGLIKGVLAKGRNGQTI
SPA      LWRRGHKPVQPMGYAFISVLQKYVLENGGKIITDSPVKELIVEEGTVKGVRAEGRNGQT
SUB      LWRRGHKPFMPMGVAFISVLNDYVLKHGGIILTDTPVKELIVENGQVRGVIGSGRNGQTI
SEQ      IWRRGHKPKVPMGVAYIAVLKNFVLKNGGIILTDTPVKELIVTDGVTGVKGSGRNGQTI
SGA      IWRRGHKPKVPMGVAFISVLKDFVLKNGGIILTDTPVKELLIITDGIIVTGKIGRNGQTI
LPA      LWRRGHKPLGSQGFAFIEALKKYLESNQGIIITDTAAKELIIEDGQVKGIARSSDGKKI
LAL      LWRRGHKPLGSQGFAFIEALKKFLEAHDGKIITDTAVKQLIIEDGQVKGIIAKSSDGKKV
LFA      IWRRGHKPMGDQGFAPIKALQKFVTDQGGRIILTETPVQSLTTTAGKVDGLIAQGPDHTKV
LPE      IWRRGHKPMGDLGFAYIQTCLKDFVEKQGGTIMTETPVQKLLVTDGQVRGVVATNADHEQV
LPL      IWRRGHKPMGDLGFAYIKTLRAFVEQQGGTMTETPVKELLVTDGQVRGVVIATNAAHEKV
LPP      IWRRGHKPMGDLGFAYIKTLRAFVEQQGGTMTETPVQELLVTDGQVRGVVIATNVAHEKV
ECO      MWRRGHKPLKSQGFAYIQALEAFIKAHQGTILTDTKVEELMVDAGKVVGLIATGRFGQKV
LDE      IWRRGHKPAKSVGYAYIEALSNYVKAHGGQIMTETDVTSLIDEDGRVCGIVATGAKGQKI
EFL      KWRRGHKPVKNEGYAFVSALHQFVKEHGGTILTDTPVKELLIIEDGKVTGIIIEGRNGQKV
ECA      KWRRGHKPVKNEGYAFVSALHQFVKEHGGTILTDTPVKELLIIEDGKVTGIIIEGRNGQKI
EPH      LWRRGHKPLKSEGYAYVSALTQFVEGNNGTILTDTAVKELIVEDGKICGVIIEGMNGQKI
EGI      LWRRGHKPLKSEGFVVSALQKFVESNQGTILTDTAVKELIIEKHVGTGIIIGTGLNGQQT
          ***   ***      *   . . .      *   . . .      *   . . .      *   . . .

```

CBE	TVHAKAVVLASGGFGANTKMLKEYNTYWSEIADDDVKTTSYAMTGDGILLGKTVGAALTG
CSA	TVHAKAVVLASGGFGANTKMLKEYNTYWSEIADDDVKTTSYAMTGDGILLGKTVGAALTG
SMU	TVHAQAVVLASGGFGANTKMLQYNTYWSNIDDDNIQTTSNPAITGDBGIRLGQSIGAALVG
SPA	LVHADAVVLASGGFGANTKMLQYNTYWTEIADDIATSNTPAVTGDBGILLGQSVGADLVG
SUB	TVNAKAVILASGGFGANTKMLQYNTYWTEIADDIKTSNTPAVTGDBGILLGQSVGADLVG
SEQ	TVNGKAVILTTGGFAANTKMLQYNTYWSEIADDDIATSNTPAATGDBGILLGQSVGADLVG
SGA	TVNGKAVILTTGGFGANTKMLQYNTYWSEIADDDIATSNTPAATGDBGILLGQSVGADLVG
LPA	IVHAKAVVLASGGFGANTKMLKQYNTYWSNIDDDNIKTTSNPAITGDBGIRLGQSAGAELVG
LAL	IVHAKAIVLASGGFGANTKMLKEYNTYWSNIDDDIMTTNSPAITGDBGIRLGQSAGAELVG
LFA	IVHAKAVILASGGFAANTKMLQYNTYWTAIDDDIKTTNSPAMTGDGIRLGTSVGADLVG
LPE	IVHADAVILASGGFAANTKMLQYNTYWTAIDDDVKTTSNPAITGDBGIRLGTSVGADLVG
LPL	IVHADAVILASGGFAANTKMLQYNTYWTAIDDDVKTTSNPAITGDBGIRLGTSVGADLVG
LPP	IIHADAVILASGGFAANTKMLQYNTYWTAIDDDVKTTSNPAITGDBGIRLGTSVGADLVG
ECO	TIHAQAVILASGGFGANTQMLKQYNTYWSKIEDDIQTSNSPAITGDBGIVLGEAVGAELVG
LDE	TIHAQAVVLASGGFGANTQMLKQYNTYWTEIADDDIQTSSNPAITGDBGIRLGQSVGADLVG
EFL	TIHAKAVILASGGFGANTKMLKQYNTYWTEIEDDIKTSNSPAITGDBGIKLGESAGADLVG
ECA	TIHAKAVILASGGFGANTKMLKQYNTYWTEIEDDIKTSNSPAITGDBGIKLGESAGADLVG
EPH	TIHAGAVVLASGGFGANTKMLKQYNTYWTEIEDDIKTSNSPAITGDBGILLGQSVGADLVG
EGI	TIHAKAVILASGGFGANTKMLKQYNTYWTQIDDDIKTSNSPAITGDBGILLGQSAGAELVG

:.: *.:*.:***.***:*.:.:*****: * *.: *: *: * ***** ** : ** *.

CBE	MGFTQMMPVADPETGELFSGVQVPPENFVMVNKEGKRFINEFSGRDVLTKAAIEQGGLFY
CSA	MGFTQMMPVADPETGELFSGVQVPPENFVMVNKEGKRFINEFSGRDVLTKAAIDQGGLFY
SMU	MGFSQMMPVSDPNTGALFSGVQVPPANFVMVNQEGKRFVDEYGSRDQLSKAAIDNGGLFY
SPA	MGFSQMMPVSDPVTGALFSGVQVPPANFIMVNTGKRFVDEYGSRDQLSKAAIDNGGLFY
SUB	MGFTQMMPVSDPETGALFSGVQVPPANFIMVNTGKRFVDEYGSRDQLSKAAIDNGGLFY
SEQ	MGFSQMMPVSDPVTGALFTGLQVPPANFIMVNTGKRFVDEYGSRDQLSKAAIDNGGLFY
SGA	MGFSQMMPVSDPVTGALFSGVQVPPANFIMVNTGKRFVDEYGSRDQLSKAAIDNGGLFY
LPA	MGFSQMMPVSDPETGELFSGVQVPPQNFVMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGSLFY
LAL	MGFSQMMPVSDPQTGELFSGVQVPPQNFVMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGSLFY
LFA	MGFSQMMPVSDPDTGELFSGVQVPPQNFVMVNQAGKRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGSLFY
LPE	MGFSQMMPVSDPNTGELFTGLQVPPANFVMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGSLFY
LPL	MGFSQMMPVSDPETGELFSGVQVPPANFVMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGSLFY
LPP	MGFSQMMPVSDPETGELFSGVQVPPANFVMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGSLFY
ECO	MGFTQMMPVSDPDTGELFSGVQVPPANFVMVNQKGRFVNEYASRDVLTKAAIDNGSLFY
LDE	MGFSQMMPVSDPETGELFTGLQVPPQNFVMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGGLFY
EFL	MGFSQMMPVSDPNTGALFSGVQVPPANFVMVNQKGRFVNEYASRDVLTKAAIDNGGLFY
ECA	MGFSQMMPVSDPNTGALFSGVQVPPANFVMVNQKGRFVNEYASRDVLTKAAIDNGGLFY
EPH	MGFSQMMPVSDPQTGALFSGVQVPPQNFIMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGGLFY
EGI	MGFSQMMPVSDPETGALFSGVQVPPQNFIMVNQKGRFVNEYGSRDQLTKAAIDNGGLFY

::*. * * :*:*.*** *:*** *:***:*. ** *:***:*.***

1656

CBE	LIADDEIKKTAANTSQEKLDQVEAGTLFRADTLEELAVKVGMDPAVLVDTINKYNSYVD
CSA	LIADDEIKKTAANTSQEKLDQVEAGTLFRADTLEELAVKVGMDPAVLVDTINKYNSYVD
SMU	LIADENIKATAMNTSNEKIEEQVAAGTLFRADTLESLAEQIGVDPATLVETINNYNSYVE
SPA	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVQKAGTLFRADTLEELAVQIGMDPQVLADTIKKYNSYVD
SUB	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVQKAGTLFRADTLEELAEQLNMEPGVLSETITNYNSYVD
SEQ	LIADENIKETAYNTSQEKIDQVEAGTLFKADTLEELAEQINIDPATLVETITNYNSYVD
SGA	LIADENIKETAYNTSQEKIDQVEAGTLFRADTLEELAEQINIDPAVLVETITNYNSYVD
LPA	LIADDAIKETAYNTSQAQIDQVEQGTLYRDDTLEGLAKQVGMDFPATFVKTINDYNSYVD
LAL	LIADDEIKKTAANTSQNKIDQVEQGTLYRDDTLEGLAKQIGMDPKVFKTINDYNSYVD
LFA	LIADDEIKKTAANTSQAKLDAQVAAGTLFRADTLESLAKQLQMDPAVLTKTIENYNSYVD
LPE	LIADDEIKKTAANTSQAKIDQVQVADGTLFRADTLEELAEQIKVDPVLTTKTISDYNHYVD
LPL	LIADDEIKKTAANTSQAKIDQVQVANGTLFRADTLEELAEQIGMDPAALTKTIADYNRYVD
LPP	LIADDEIKKTAANTSQAKIDQVQVANGTLFRADTLEELAEQIGMDPAVLTKTIADYNRYVD
ECO	LIADDEIKKTAANTSQAKIDQVEKGRFLFRADTLEELAEQIKVDPATLQKTIQYNYHCVA
LDE	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVQVAGTLFRADTLEELAEQIGMDPAVFEQTIANYNYAD
EFL	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVQVAGTLFRADTLEELAEQIGMDPAVLEATVAKYNSYVD
ECA	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVQVAGTLFRADTLEELAEQIGMDPAVLEATVAKYNSYVD
EPH	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVEAGTLFRADTLEELAEQIGMDASVVFETITNYNSYVD
EGI	LIADDEIKKTAANTSQEKIDQVQVAGTLFRADTLEELAEQIGMDASVVFETITNYNSYVD

****: * * * * : : : * * * : : : * * : : : : * : .** .

```

CBE  AGFDPEFHKDTFSLKVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTKAHVLDENDKPIKNLYAAG
CSA  AGFDPEFHKDTFSLKVEKAPFYATPRKPAIHHTMGGLKIDTKAHVLDENDKPIKNLYAAG
SMU  AGYDPEFDKGAFDLKVVEKAPFYATPRKPATHHTMGGLKIDTQAHVIKEDGNKIPSLYAAG
SPA  AGFDPEFNKGSFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTSTHVLNEKGQIIPGLYAAG
SUB  QGYDPEFHKGAFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTHAHVINLQGQVIPGLYAAG
SEQ  AGHDPEFDKGAFDLKVVEKAPFYATPRKPATHHTMGGLKIDTHAHVINEDGKI I KGLFAAG
SGA  AGHDPEFDKGAFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTKAHVINENGQTIKGLFAAG
LPA  VGEDPEFHKSADF LKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTDAHVINQDEKIIPGLYAAG
LAL  QGEDPEFHKNADF LKVQTA PFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTDAHVINQDGKIITGLYAAG
LFA  AGEDPEFHKNADF LKVQVAPFYATPRKPATHHTMGGLKIDTGAHVNLADGQVIDGLYAAG
LPE  TGSDPEFHKTAFDLKVVEKAPFYATPRKPATHHTMGGLKIDTGAHVLDHQQQPIDGLYAAG
LPL  AGEDPEFHKTAFDLKVAVAPFYATPRKPATHHTMGGLKIDSDAHVLNTDGQVIDGLYAAG
LPP  AGKDPEFHKTAFDLKVAVAPFYATPRKPATHHTMGGLKIDTDAHVLNTDGRIINGLYAAG
ECO  IGEDKEFGKNVFDLPVKVAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTKTHVIDKTGQVIPGLYAAG
LDE  EGLDPEFGKDVFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTKAHVINETGQVIKGLYAAG
EFL  AGKDPEFGKDVFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDPQTHVLTKEQIIEGLYAAG
ECA  AGKDPEFGKDVFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDPQTHVLTKEQIIEGLYAAG
EPH  RGEDPEFGKDVFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDANTHVLNKSGEVISGLYAAG
EGI  VGHDPFEGKDVFDLKVVEKAPFYATPRKPAVHHTMGGLKIDTGTHTVLNGQGQIIPGLYAAG
      * * * * * . * : * : . * . * : * :

CBE  EVAGGIHAGNRLGGNALTDI FTFGRIAGKTAIDEMK-----
CSA  EVAGGIHAGNRLGGNALTDI FTFGRIAGKTAIDEMK-----
SMU  EVTGGI HAGNRLGGNALADI FTFGRIAAETA VTECC-----
SPA  EVAGGLHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAGQTAVKENC-----
SUB  EVAGGLHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIATETA I KEHC-----
SEQ  EVAGGLHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIATDTA I KEYLD-----
SGA  EVAGGLHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIATDTA I AEYLG-----
LPA  EVAGGIHAGNRLGGNSLSDI FTFGRIAA NNALKDME-----
LAL  EVAGGIHAGNRLGGNSLSDI FTFGRIAA NNALKDM-----
LFA  EVAGGIHAGNRLGGNSLADI FTFGRIAA TNALQDELTVTPLG
LPE  EVAGGIHAGNRLGGNSLSDI FTFGRIAA ANALADHETAVTE-
LPL  EVAGGIHAGNRLGGNSLSDI FTFGRIAA AHAVA EHVDPVTA-
LPP  EVAGGIHAGNRLGGNSLSDI FTFGRIAA AHAVA EHVDSVTA-
ECO  EVAGGIHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAGQTAVSEWL-----
LDE  EVAGGIHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAA HNIAIEAAE-----
EFL  EVAGGIHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAGKTAVAEHLE-----
ECA  EVAGGIHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAGKTAVAEHLE-----
EPH  EVAGGIHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAGVMVAVKELG-----
EGI  EVAGGIHAGNRLGGNSLTDI FTFGRIAGKTALQDTLVNE---
      ** : ** : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Lp_1425 con proteínas similares presentes en las bases de datos. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal Omega a partir de las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. Las secuencias de aminoácidos pertenecen a *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (LPL) (F9UNH3), *L. paraplantarum* DSM 10667 (LPP) (A0A0R1QJE0), *L. pentosus* DSM 20314 (LPE) (A0A0R1FXD4), *L. fabifermentans* DSM 21115 (LFA) (A0A0R2NPE4), *L. alimentarius* DSM 20249 (LAL) (A0A0R1K448), *L. paraalimentarius* DSM 13961 (A0A0R1I2J3), *L. dextrinicus* DSM 20335 (LDE) (A0A0R2BIK6), *Enterococcus phoeniculicola* ATCC BAA-412 (EPH) (R3TK57), *E. columbae* DSM 7374 (ECO) (S0KK72), *E. flavescens* ATCC 49996 (EFL) (R2PHW6), *E. casseliflavus* ATCC 12755 (ECA) (F0EFK5), *E. gilvus* ATCC BAA-350 (EGI) (R2V727), *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15912 (SPA) (F8DIF2), *S. uberis* ATCC BAA-854 (SUB) (B9DVC8), *S. equinus* ATCC 9812 (SEQ) (E8JQB5), *S. gallolyticus* ATCC 43143 (SGA) (F5WWW2), *S. mutans* ATCC 700610 (SMU) (Q8DW88), *Clostridium beijerinckii* ATCC 51743 (CBE) (A6LV44) y *C. saccharobutylicum* DSM 13864 (CSA) (U5MMB3). Identidad entre aminoácidos (*), cambio no conservativo (:) y cambio conservativo (.). La secuencia codificada por los oligonucleótidos 1655 y 1656 se indica marcada en amarillo y con flechas.

Utilizando ADN extraído de 47 bacterias lácticas tanto de la especie *L. plantarum* (26 cepas) como de otras 14 especies de bacterias lácticas (21 cepas) (**Tabla 3**) y mediante PCR con los oligonucleótidos degenerados 1655 y 1656 se comprobó la presencia de genes similares en estas bacterias lácticas.

De las cepas analizadas no se obtuvo amplificación del gen *lp_1425* en las pertenecientes a las especies *Lactobacillus brevis*, *L. sakei*, *L. fructivorans*, *Leuconostoc citreum*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. hirae*. Por el contrario, se obtuvo una amplificación positiva con todas las cepas de las especies del grupo de *L. plantarum* (*L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*) así como en las cepas analizadas de *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* (**Figura 28**). Los resultados obtenidos indican que todas las cepas analizadas del grupo de *L. plantarum* poseen el gen que codifica la proteína Lp_1425. Estos datos se han confirmado mediante una búsqueda en las bases de datos que ha revelado que todas las cepas del grupo *L. plantarum* cuyo genoma se ha secuenciado completamente (como por ejemplo, *L. plantarum* ECFS1, UCMA3037, Lp90, WHE92, NC8, 4_3, IPLA88, ZJ316, 16, AY01. ST-III, B21, DOMLA, CMPG5300, JDM1, 2165 y EGD-AQY, *L. pentosus* IG1, MP-10 y KCA1, *L. paraplantarum* L-Z59, y *L. fabifermentans* T30PCMOL) poseen un gen similar a *lp_1425* (datos no mostrados).

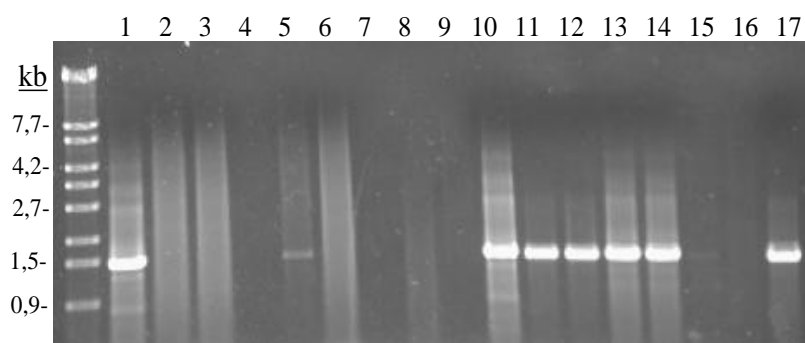


Figura 28. Amplificación mediante PCR de genes que codifican proteínas similares a *Lp_1425* en bacterias lácticas. La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos 1655 y 1656 y el ADN cromosómico de las cepas *Enterococcus casseliflavus* DSM 20680 (1), *E. durans* DSM 20633 (2), *E. faecalis* DSM 20478 (3), *E. faecium* CECT 4102 (4), *E. gallinarum* DSM 24841 (5), *E. hirae* DSM 20160 (6), *Lactobacillus brevis* CECT 5354 (7), *L. fermentum* CECT 4007 (8), *L. fructivorans* CECT 4785 (9), *L. paraplantarum* DSM 10641 (10), *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* DSM 16365 (11), *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917 (CECT 748) (12), *L. plantarum* DSM 10492 (13), *L. pentosus* DSM 16366 (14), *L. sakei* subsp. *carneus* DSM 15831 (15), *Leuconostoc citreum* CECT 4025 (16), y *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (17). Algunos fragmentos del marcador de peso molecular λ /EcoT14I (Takara) están representados en la izquierda.

Para estudiar la relación entre la presencia del gen *lp_1425* y la actividad reductasa de ácidos hidroxicinámicos se cultivaron las 47 cepas de bacterias lácticas, en las que se había realizado el estudio mediante PCR, en medio MRS o BHI conteniendo 1,5 mM de ácido *m*-cumárico a 30 °C durante cinco días. Después de la incubación, los compuestos fenólicos presentes en los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. La **Figura 29** muestra los resultados obtenidos.

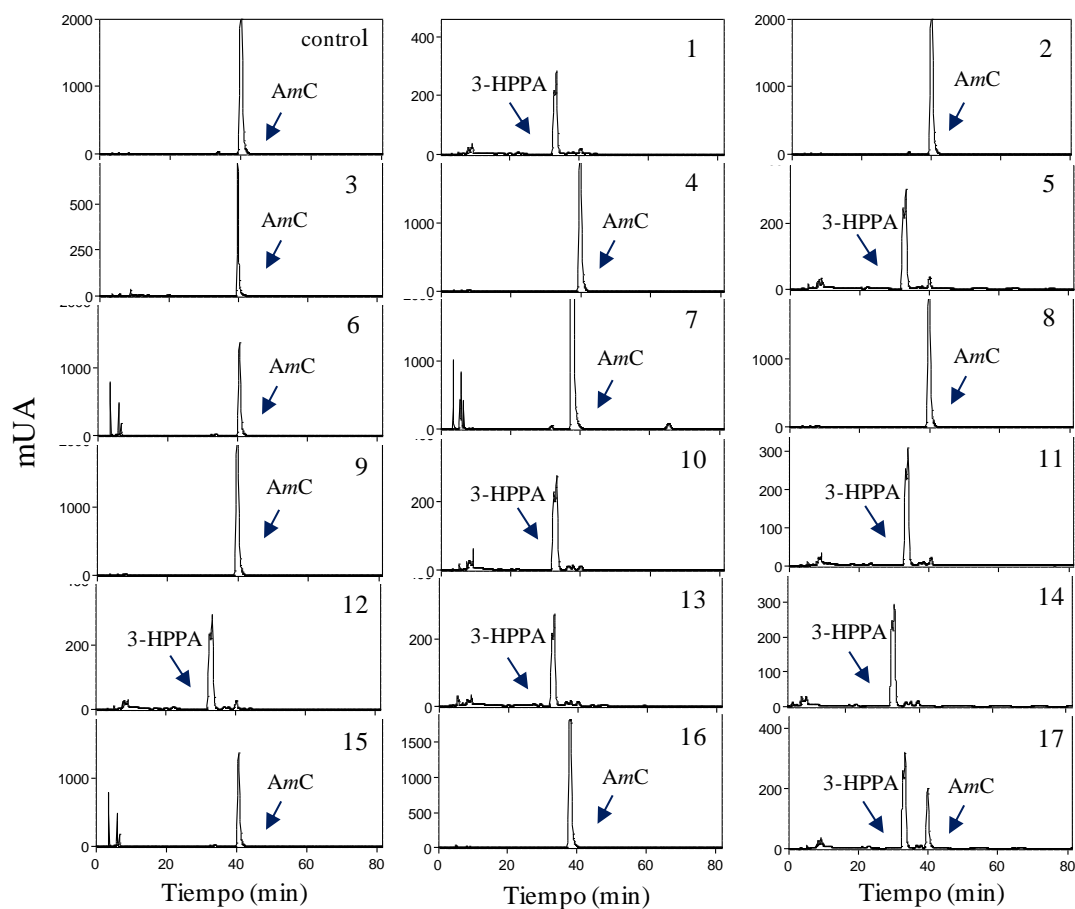


Figura 29. Reducción del ácido *m*-cumárico en cultivos de *Enterococcus casseliflavus* DSM 20680 (1), *E. durans* DSM 20633 (2), *E. faecalis* DSM 20478 (3), *E. faecium* CECT 4102 (4), *E. gallinarum* DSM 24841 (5), *E. hirae* DSM 20160 (6), *Lactobacillus brevis* CECT 5354 (7), *L. fermentum* CECT 4007 (8), *L. fructivorans* CECT 4785 (9), *L. paraplantarum* DSM 10641 (10), *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* DSM 16365 (11), *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917 (CECT 748) (12), *L. plantarum* DSM 10492 (13), *L. pentosus* DSM 16366 (14), *L. sakei* subsp. *carneus* DSM 15831 (15), *Leuconostoc citreum* CECT 4025 (16), y *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (17). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 30 °C en medio MRS conteniendo ácido *m*-cumárico a una concentración de 1,5 mM. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. AmC, ácido *m*-cumárico; 3-HPPA, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico.

En todas las cepas analizadas los resultados obtenidos mediante HPLC coinciden con los resultados obtenidos en el ensayo de PCR, de manera que todas las cepas de las especies del grupo *L. plantarum* (31 cepas) fueron capaces de reducir el ácido *m*-cumárico presente en el medio de cultivo, y amplificaron mediante PCR el fragmento de 1422 pb correspondiente al gen *lp_1425*. Además, las cepas analizadas de las especies *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus* DSM 20680) y *E. gallinarum* (*E. gallinarum* DSM 24841) también redujeron el ácido *m*-cumárico y amplificaron el fragmento esperado del gen *lp_1425* (**Figura 28 y 29**). Por el contrario, las cepas que no produjeron amplificación del gen mediante PCR, tampoco fueron capaces de reducir el ácido *m*-cumárico (**Figura 28 y 29**). Coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis, estudios llevados a cabo por Filannino *et al.* (2014) muestran que cepas de las especies *L. brevis* (*L. brevis* POM2 y POM4), y *L. fermentum* (*L. fermentum* F1) no redujeron los ácidos hidroxicinámicos presentes en el medio de cultivo (**Tabla 5**). Aunque en esta tesis no se han estudiado cepas de las especies *Lactobacillus rossiae* y *Leuconostoc mesenteroides*, se ha descrito que son capaces de reducir el ácido *p*-cumárico, cafeico o ferúlico (Filannino *et al.*, 2014). Por el contrario, la cepa *L. curvatus* PE5 y cepas de *Weissella cibaria* (P9, P10, 3XMR5, POM12) redujeron los ácidos *p*-cumárico, cafeico o ferúlico a ácido florético, ácido hidrocafeico o ácido hidroferúlico, respectivamente (Filannino *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos con las cepas de *L. brevis* estudiadas en esta tesis CECT 5354 y CECT 4121 coinciden con los publicados previamente respecto a su incapacidad para reducir los ácidos hidroxicinámicos presentes en el medio de cultivo (Curiel *et al.*, 2010).

Tabla 5. Reducción de ácido *m*-cumárico en bacterias lácticas

Especie	Cepa	AmC	
		HPLC	PCR
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSM 20680	+	+
<i>Enterococcus durans</i>	DSM 20633	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20478	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4102	-	-
	DSM 20477	-	-
	DSM 24841	+	+
<i>Enterococcus gallinarum</i>	DSM 20160	-	-
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 367 (CECT 5354)	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 216	-	-
	CECT 4121	-	-
	CECT 4007	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 4785	-	-
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 10641 (ATCC 10776)	+	+
	DSM 10667 ^T (ATCC 10667 ^T)	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	+	+
	subsp. <i>argenteratensis</i> DSM 16365	+	+
	subsp. <i>plantarum</i> DSM 20174	+	+
	subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T (CECT 748 ^T)	+	+
	NC8	+	+
	CECT 220	+	+
	CECT 221	+	+
	CECT 223	+	+
	CECT 224	+	+
	CECT 749 (ATCC 10241)	+	+
	CECT 4645	+	+
	DSM 1055	+	+
	DSM 2648	+	+
	DSM 10492	+	+
	DSM 13273	+	+
	DSM 20246	+	+
	RM28	+	+
	RM31	+	+
	RM35	+	+
	RM38	+	+
	RM39	+	+
	RM40	+	+
	RM41	+	+
	RM71	+	+
	RM72	+	+
	RM73	+	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSM 16366	+	+
	DSM 20314	+	+
	DSM 20199	+	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	subsp. <i>carneus</i> DSM 15831	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	CECT 4025	-	-
	CECT 4700	-	-
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	UCN34	+	+

Las actividades reductasa descritas pueden tener un significado fisiológico específico para estas especies. Las bacterias lácticas se pueden beneficiar energéticamente de la utilización de aceptores externos de electrones para una regeneración más eficiente del el cofactor NAD(P)H, lo que permitiría un consumo más eficiente de la fuente de carbono y un consiguiente aumento de la síntesis de ácido acético a partir de acetyl fosfato, con la ganancia asociada de ATP. Filannino *et al.* (2014) demostraron que en la mayoría de las condiciones de cultivo, la actividad reductasa de ácidos hidroxycinámicos se correlacionó con los mayores niveles de ATP (intracelular y relación ATP teórico/glucosa) y la más alta relación NAD^+/NADH .

Los alimentos fermentados son ecosistemas en los que estas rutas metabólicas se pueden llevar a cabo mediante aceptores alternativos de electrones (aldehídos durante la fermentación de zumos de frutas y vegetales) o mediante la adición de los mismos (por ejemplo, fructosa durante la fermentación) (Filannino *et al.*, 2014). Es indispensable una alta tolerancia a altas concentraciones de estos ácidos fenólicos para obtener tasas óptimas de crecimiento en estos sustratos alimentarios. Por ello, las bacterias lácticas capaces de reducir los ácidos hidroxycinámicos pueden proporcionar la necesaria regeneración de NAD^+ y un consumo más eficiente de la fuente de carbono al utilizar estos ácidos fenólicos como aceptores de electrones externos y así obtener energía metabólica adicional para contrarrestar las condiciones estresantes generadas por los compuestos fenólicos.

2. Metabolismo de vinil fenoles

Los resultados publicados antes del inicio de esta tesis indican que una de las rutas en el metabolismo de ácidos hidroxicinámicos implica la acción secuencial de dos enzimas, en primer lugar estos ácidos se descarboxilan a sus vinil derivados, los cuales por acción de una reductasa se convierten en sus correspondientes etil derivados (Chatonnet *et al.*, 1992, 1995, 1997; Snowdon *et al.*, 2006). Tal como se ha descrito en apartados anteriores, los sobrenadantes de cultivos de *L. plantarum* crecidos en presencia de algunos ácidos hidroxicinámicos, como los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, mostraban la presencia de los correspondientes vinil y etil fenoles, originados por la descarboxilación y posterior reducción de los mismos, respectivamente (Rodríguez *et al.* 2008a). Sin embargo, extractos celulares no inducidos de *L. plantarum* no fueron capaces de reducir los vinil fenoles originados por la descarboxilación de estos ácidos. Con ninguno de los ácidos ensayados se observó la reducción de los vinil derivados producidos. Por todo ello estos resultados indican que las proteínas implicadas en la reducción de los vinil derivados de los ácidos hidroxicinámicos son enzimas inducibles. Por este motivo, la actividad reductasa de vinil fenoles no está presente en los extractos celulares y si en los cultivos en los que se ha inducido dicha enzima.

2.1. Identificación de la proteína reductasa de vinil fenoles en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Las técnicas que permiten conocer los cambios que ocurren en la expresión génica global en respuesta a la presencia de un determinado compuesto son aproximaciones experimentales adecuadas para identificar los genes que se inducen en esa situación. Como ya se ha comentado anteriormente, el estudio transcriptómico global de la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 a la presencia de 1,5 mM de ácido *p*-cumárico reveló la inducción de genes que codificaban proteínas anotadas como “reductasas” (Reverón *et al.*, 2012). Estos genes eran

lp_1424, *lp_1425* y *lp_3125*. La interrupción de dichos genes en *L. plantarum* permitió conocer la implicación de los genes *lp_1424* y *lp_1425* en la reducción del ácido *m*-cumárico, y que sólo la interrupción del gen *lp_3125* ocasionaba la pérdida de la capacidad para reducir el 4-vinilfenol presente en el medio de cultivo (**Figura 5**). Esto indica la necesidad, al menos, de la proteína Lp_3125 funcional para obtener etil fenoles a partir de la reducción de los vinil derivados de los ácidos hidroxycinámicos.

2.1.1. Organización genética de la región adyacente al gen *lp_3125* en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Como se ha descrito anteriormente, el cultivo de la cepa *L. plantarum* WCFS1 con el gen *lp_3125* delecionado demuestra claramente su implicación en la reducción de 4-vinilfenol y posiblemente de otros vinil fenoles. Al igual que se hizo con los genes *lp_1424* y *lp_1425* en un apartado anterior de esta tesis, se decidió conocer la organización genética de la región que rodea al gen *lp_3125* en *L. plantarum* WCFS1.

Se realizó el análisis de la región comprendida entre los genes *lp_3123* y *lp_3127*, que contiene cuatro marcos de lectura abierta (ORF), dos de ellos corriente arriba (“*upstream*”) y otro corriente abajo (“*downstream*”) del gen implicado en la actividad reductasa de 4-vinilfenol (**Figura 30A**). Las dos ORFs situadas *upstream* se transcriben divergentemente respecto a *lp_3125*. La primera de las ORFs (*lp_3123*) codifica una proteína 48% idéntica a una pirofosfatasa de *Lactobacillus malefermentans* DSM 5705 (código de acceso A0A0R1ZZD0). Lp_3123 codifica una proteína de 274 aminoácidos y 31,2 kDa, anotada como posible pirofosfatasa, NADH-pirofosfatasa o NAD⁺ difosfatasa. La siguiente ORF, *lp_3124*, codifica una proteína de 302 aminoácidos y 34,1 kDa que es 54 % idéntica a un regulador transcripcional de *L. malefermentans* DSM 5705 (acceso A0A0R2A2P9). Lp_3124 está anotada como posible regulador transcripcional, regulador transcripcional del tipo HTH

o como regulador transcripcional de la familia LysR. Posteriormente se encuentra la proteína implicada en la reducción de 4-vinilfenol, Lp_3125, una proteína de 493 aminoácidos y 53,2 kDa, que es 75% idéntica a una proteína anotada como fumarato reductasa de *L. malefermentans* DSM 5705 (acceso A0A0R2A9X2). Lp_3125 aparece anotada como posible fumarato reductasa, subunidad flavoproteína de la fumarato reductasa, o como proteína con dominio de unión a FAD. Por último, la ORF que se encuentra *downstream* de *lp_3125*, *lp_3127*, codifica una proteína de 1189 aminoácidos de 123,5 kDa. Esta proteína está anotada como proteína de unión a mucosas con un motivo LPXTG de anclaje a la pared celular, o como proteína de anclaje celular, proteína de superficie celular de la familia GY, o como serin proteasa. La proteína Lp_3127 es 35% idéntica a una proteína no caracterizada de *Lactobacillus zymae* DSM 19395 (A0A0R1MFK5).

2.1.2. Análisis transcripcional de la región adyacente al gen *lp_3125* en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Con objeto de conocer la organización transcripcional del gen *lp_3125* y los genes adyacentes a él, se realizó un estudio *in silico* para identificar posibles promotores y terminadores de la transcripción. La búsqueda de promotores para organismos procariotas y la búsqueda de terminadores de la transcripción Rho-independientes se realizó utilizando los programas descritos en el apartado 1.1.2. de Resultados y Discusión de esta tesis. Mediante esta búsqueda *in silico* se identificaron posibles promotores situados *upstream* los genes *lp_3124*, *lp_3125* y *lp_3127*, identificando también los posibles sitios de inicio de la transcripción. Respecto a los terminadores de la transcripción éstos se situaron *downstream* *lp_1420*, *lp_1422*, *lp_1426* y *lp_1427* (**Figura 30A**).

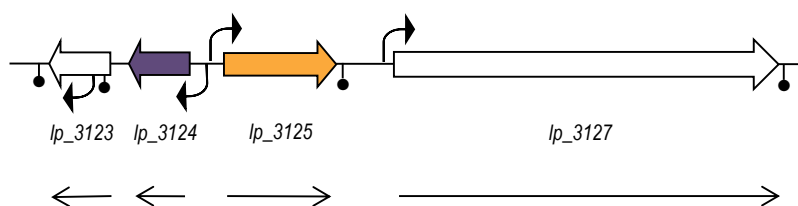
Con objeto de comprobar estas predicciones *in silico*, se realizaron experimentos de transcripción reversa utilizando ARNm obtenido a partir de *L. plantarum* WCFS1 cultivado en presencia de 4-vinilfenol (1.5 mM). El ADNc

se obtuvo como se describe en el apartado 5.4.1. de Material y Métodos. El ADNc obtenido se utilizó para amplificar mediante PCR fragmentos internos de los genes *lp_3123* (oligonucleótidos 1810 y 1811, amplifican 617 pb), *lp_3124* (oligonucleótidos 1686 y 1687, amplifican 596 pb), *lp_3125* (oligonucleótidos 891 y 892, amplifican 472 pb), y *lp_3127* (oligonucleótidos 1812 y 1813, amplifican 573 pb). De manera similar, también se amplificaron las uniones entre las ORFs implicadas, la región intergénica *lp_3123-lp_3124* (oligonucleótidos 1684 y 1685, amplifican 613 pb), *lp_3124-lp_3125* (oligonucleótidos 1688 y 1689, amplifican 800 pb) y finalmente, *lp_3125-lp_3127* (oligonucleótidos 1470 y 1690, amplifican 804 pb).

La **Figura 30B** muestra que el único fragmento que se amplificó fue el correspondiente al fragmento interno de 772 pb del gen *lp_3125*. El resto de genes analizados (*lp_3123*, *lp_3124* y *lp_3127*) no presentaron amplificación así como ninguna de las regiones intergénicas analizadas; los datos indican que estos genes y regiones no se transcriben en las condiciones ensayadas. Los resultados sugieren que el gen *lp_3125* se transcribe solo, y de hecho *in silico* se identificó un posible terminador de la transcripción en la región *lp_3125-lp_3127* con $\Delta G = -10,5$ kcal/mol.

Los datos experimentales de transcripción reversa coinciden con los obtenidos *in silico* respecto a la transcripción de *lp_3125* puesto que ambos determinan que *lp_3125* se transcribe como un único ARN monocistrónico.

A



B

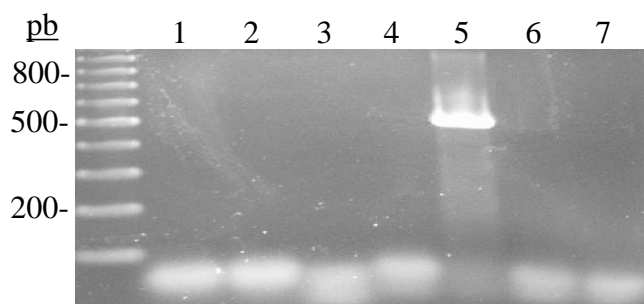


Figura 30. (A). Organización genética de la región adyacente al gen *lp_3125* implicado en la reducción de 4-vinilfenol. Se representa la región de *L. plantarum* WCFS1 (número de acceso NC_004567.2, posiciones 2.788.661 a 2.798.829). Las flechas indican genes. Se indica la localización de posibles promotores y terminadores de la transcripción. También se señala el tamaño y dirección de los transcritos obtenidos mediante transcripción reversa. (B) Análisis transcripcional mediante RT-PCR de la región adyacente al gen *lp_3125* implicado en la reducción de 4-vinilfenol. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con parejas de oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes o las regiones intergénicas a partir del ADNc de *L. plantarum* WCFS1. Las regiones amplificadas son un fragmento interno de *lp_3123* de 617 pb amplificada con los oligos 1810 + 1811 (1), región intergénica *lp_3123-lp_3124* de 613 pb amplificada con 1684+1685 (2), fragmento interno de *lp_3124* de 596 pb amplificado con 1686+1687 (3), región intergénica *lp_3124-lp_3125* de 800 pb amplificada con 1688+1689 (4), fragmento interno de *lp_3125* de 472 pb amplificado con 891+892 (5), región intergénica *lp_3125-lp_3127* de 804 pb amplificada con 1470+1690 (6), y fragmento interno de *lp_3127* de 573 pb amplificado con 1812 +1813. En el lado izquierdo se muestra el marcador de peso molecular (100 pb Ladder, Biotools) señalándose algunos de los tamaños.

2.1.3. Implicación de los genes adyacentes a *lp_3125* en la reducción de vinil fenoles

En el apartado 1.1. de Resultados y Discusión de esta tesis se identificaron los genes implicados en la reducción de ácidos hidroxycinámicos (*lp_1424* y *lp_1425*) así como un gen implicado en la reducción de 4-vinilfenol (*lp_3125*). Se comprobó que la cepa mutante de *L. plantarum* WCFS1 que posee el gen *lp_3125* interrumpido era incapaz de transformar 4-vinilfenol (**Figura 5**). Esto indica la necesidad, al menos, de la proteína Lp_3125 funcional para obtener 4-etilfenol a partir de la reducción del 4-vinilfenol. Aunque el estudio de transcripción reversa revela que el gen *lp_3125* se transcribe solo, los datos de comparación de secuencias indican que la proteína Lp_3124 podría ser el regulador transcripcional implicado en la regulación de la biosíntesis de la proteína Lp_3125. Para determinar la implicación del gen *lp_3124* en la reducción de 4-vinilfenol, el gen se interrumpió en *L. plantarum* y se comprobó la actividad bioquímica presentada por la cepa mutante.

El mutante se construyó mediante la estrategia utilizada para la obtención de los otros mutantes utilizados anteriormente en esta tesis. Esta estrategia consistió en la inserción de un plásmido no replicativo en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1. Un fragmento interno de 308 pb del gen *lp_3124* amplificado con los oligonucleótidos 1633+1634 se clonó en el plásmido pUCE191 (Arrecubieta *et al.*, 1995). Una vez construido el plásmido pUCE191-3124*, éste se utilizó para transformar *L. plantarum* y las colonias recombinantes se seleccionaron por su resistencia a eritromicina. Mediante PCR se comprobó la correcta integración del plásmido utilizando el oligonucleótido 1233, que hibrida en el plásmido pUCE191, y el oligonucleótido 1635 que hibrida con el gen *lp_3124* en una región externa al fragmento insertado.

Después de comprobar la correcta inserción del plásmido pUCE191-3124* en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 y la correspondiente interrupción de la copia del gen *lp_3124* en el cromosoma, se realizó un cultivo de la cepa junto con la cepa *L. plantarum* WCFS1Δ3125 obtenida previamente. Ambas cepas,

con los genes *lp_3124* y *lp_3125* interrumpidos se cultivaron en MRS en presencia de 4-vinilfenol a una concentración 1,5 mM durante cinco días a 30 °C. Después de esta incubación los compuestos fenólicos se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Se observó que la interrupción de los dos genes estudiados, *lp_3124* y *lp_3125*, ocasiona la pérdida de la capacidad para reducir 4-vinilfenol a 4-etilfenol (**Figura 31**). Es decir, la ausencia de un posible regulador transcripcional (Lp_3124) y de una proteína reductasa (Lp_3125) funcionales dá lugar a cepas de *L. plantarum* incapaces de reducir 4-vinilfenol.

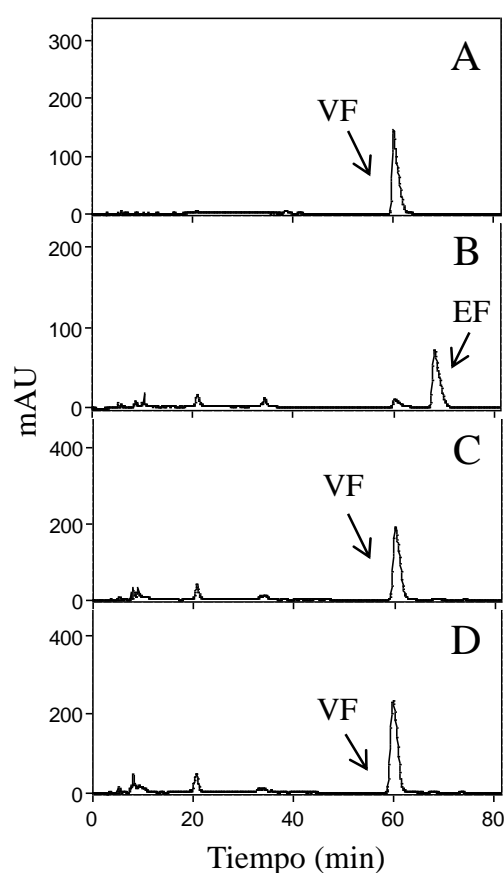


Figura 31. Reducción de 4-vinilfenol en cultivos de *L. plantarum* WCFS1 (B), y de las cepas con genes interrumpidos, *L. plantarum* WCFS1 Δ 3124 (C) y *L. plantarum* WCFS1 Δ 3125 (D), y control del medio (A). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 30 °C en medio MRS conteniendo 4-vinilfenol a una concentración de 1,5 mM. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. VF, 4-vinilfenol; EF, 4-etilfenol.

Al igual que lo que ocurre en la reducción de ácidos hidroxycinámicos, la presencia de un posible regulador transcripcional de la familia LysR es necesaria para la actividad vinilfenol reductasa. La proteína Lp_3124 es una proteína de 302 aminoácidos anotada como posible regulador transcripcional, regulador transcripcional del tipo HTH o como regulador transcripcional de la familia LysR. Estos reguladores suelen poseer un dominio de unión al cofactor en el extremo C-terminal y un dominio HTH (hélice-giro-hélice, “*helix-turn-helix*”) de unión a ADN en el extremo N-terminal. Este último está presente en casi todas las proteínas de unión a ADN en procariotas y originariamente estaba formado por tres hélices en una conformación abierta. La segunda y tercera de estas hélices interaccionaban directamente con el ADN en tanto que la tercera se insertaba en el surco mayor de la doble hélice de ADN (Brennan y Matthews, 1989) (**Figura 32**). Este motivo HTH ha evolucionado y se ha diversificado, dando lugar a diferentes variantes, como los miembros de la familia LysR, que poseen una horquilla β entre la segunda y tercera hélice (Maddocks y Oyston, 2008) (**Figura 32**).

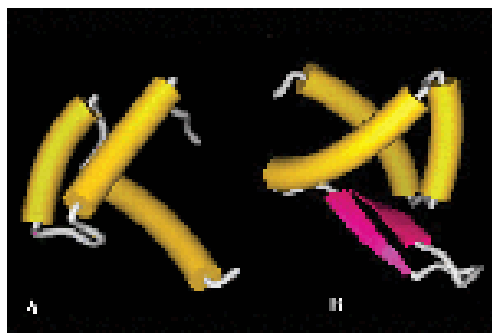


Figura 32. Representaciones tridimensionales de los dominios HTH de unión a ADN (adaptado de las estructuras de las proteína 1k78 y 1smt de las bases de datos mediante el programa Rasmol). (A) Motivo HTH original que es un haz de tres hélices en una configuración abierta; (B) Motivo HTH-alas de hélice que tiene una región de lámina β antiparalela. Los reguladores transcripcionales de la familia LysR pertenecen al tipo HTH-alas de hélice (adaptado de Maddocks y Oyston, 2008).

Al igual que la proteína Lp_1422, la proteína Lp_3124 parece ser un activador transcripcional puesto que su interrupción inhibe la actividad catalítica de la proteína Lp_3125. Por lo que, para la regulación que ejerce Lp_3124 en la reducción de 4-vinilfenol, se puede proponer un modelo similar al reflejado en la **Figura 8** para el activador Lp_1422 implicado en la reducción de ácidos hidroxicinámicos. Asumiendo que una mínima cantidad de Lp_3124 producida en condiciones fisiológicas normales es suficiente para reprimir su propia expresión, la presencia de 4-vinilfenol y su posterior unión a Lp_3125 ocasiona un cambio de conformación que hace que Lp_3124 se separe del ADN y queda libre. Posteriormente, la proteína Lp_3124 en su nueva conformación puede unirse a otra región de ADN y activar así la transcripción de *lp_3125*. A pesar de que las proteínas Lp_1422 y Lp_3124 están anotadas como reguladores transcripcionales de la familia LysR, y que ambas parecen actuar como activadores, sin embargo, sólo presentan un 21% de identidad en su secuencia de aminoácidos (**Figura 33**).

Lp_1422	MPKSDSSEMRRFLDVLLKHGNFTRAADLYISQPYLTQSIRNVEKELGVTIINREVTPLR
Lp_3124	---MDLDRLQTFK-VVQYGSFQQVAAREYRSQRTVSKQMTQLENELKVTFLFDRGQNRIQ
	* . . . : * . : . : * . * . * * : . : : : : * : * : * : * . : :
Lp_1422	LTTAGRTYYQYLTALENEKDYFNKQIRQYTHANQQVIRLGVLSLGGYLLPLFLPAFLKA
Lp_3124	LTPQGRLEWASQDIVNNYTTALTELRFNFVPTDQILRVGYFSAFEQRLLLPALYDLKQQ
	** * * : : : * : : . : * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Lp_1422	HPATKIELTEDIASRNEQRLVHGEFLDGLIGQNPETIAPGLESYDRGRDGYAIIPNTVNW
Lp_3124	HSELQLVVRQGSNEHLAQVADGSLDLALSINYGPAVTPESQLTAVPIYHNMVIGVSR
	* : : : . : * : * . * : : . * * * * . * : : * .
Lp_1422	YQPHQAFINPGALPLNDLLQAPLVL-SPHGSSIRRVQVDYLLQKHNVTPNIVI-----ES-
Lp_3124	LNPLS---RLSQLPPSALATLPILYSPESST-----FLLESFLASAPFIQDYEQIRRV
	: * . . . * * . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Lp_1422	TNTATITKLATAGLGITFLPDSVHTQPDPERYNILPLPQALMSLNIFYAFPAEHSNLNQE
Lp_3124	SSAEQMHLVALNQALAFYPAGLVPTKHDEQVAYLPITDAAQQGYDIVALLKSN----RS
	: : : : * : . : * : * . : . * : * : * : * : * : * : * : *
Lp_1422	KDLVTIFLTQLEADLAQSSTIS
Lp_3124	RPLIAKLVQRLKANAKSDE---
	: * : : : * : * : . . .

Figura 33. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína Lp_1422 y Lp_3124 de *L. plantarum* WCFS1 anotadas como reguladores transcripcionales de la familia LysR. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa Clustal Omega. Se indica (*) identidad entre aminoácidos; (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo.

2.1.4. Clonación del gen y producción de la proteína Lp_3125

La interrupción del gen *lp_3125* en *L. plantarum* WCFS1 ocasiona la pérdida de la capacidad para reducir 4-vinilfenol. Este resultado indica que la proteína Lp_3125 es una proteína necesaria para la reducción de 4-vinilfenol.

La proteína Lp_3125 está anotada como posible fumarato reductasa, subunidad flavoproteína de la fumarato reductasa, o como proteína con dominio de unión a FAD. Tal como muestra la **Figura 34**, desde aproximadamente el aminoácido 30 hasta el final de la proteína se identifica el dominio conservado COG3573 de posibles oxidorreductasas. Además, a lo largo de toda la proteína se observa similitud con proteínas de unión a NAD(P)H/NAD(P)⁺ que poseen el plegamiento de Rossmann. Este plegamiento es un motivo estructural de proteínas de unión a nucleótidos, particularmente el cofactor NAD (Caetano-Anollés *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008; Wierenga *et al.*, 1986). La estructura está compuesta por tres o más láminas β paralelas unidas por dos hélices α en el orden topológico de β - α - β - α - β formando una superestructura de hoja β (Lesk, 1995; Rao y Rossmann, 1973).

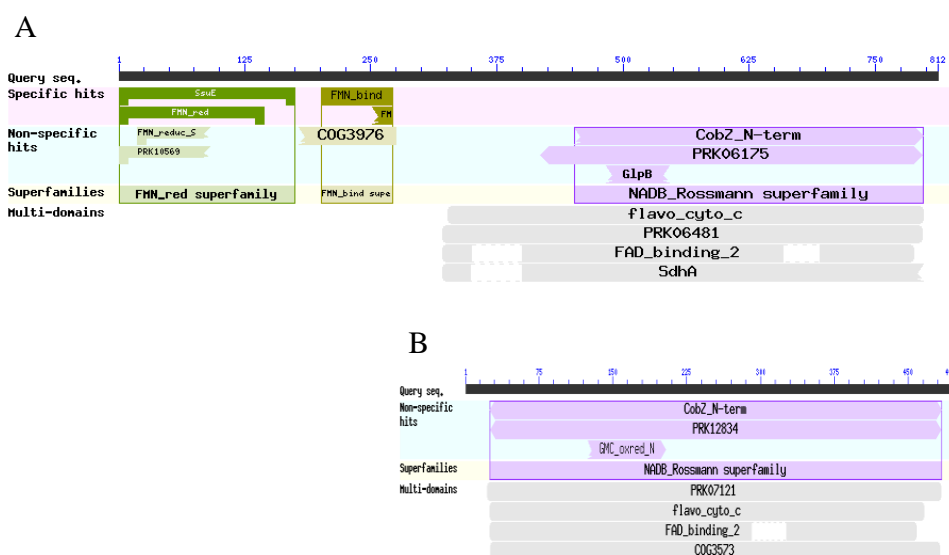


Figura 34. Identificación de dominios conservados en las proteínas Lp_1425 (A), y Lp_3125 (B). La búsqueda se realizó en la dirección <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. La línea negra superior representa la proteína desde su extremo N-terminal al C-terminal. La posición de los aminoácidos en la proteína Lp_1425 se señala cada 25 aminoácidos y en la proteína Lp_3125 cada 15 aminoácidos.

La unión del NAD(P) implica numerosos enlaces por puente de hidrógeno y contactos de tipo Van der Waals y en particular el establecimiento de un puente de hidrógeno entre residuos situados en un giro presente entre la primera lámina β del plegamiento de tipo Rossmann y la siguiente hélice α . De forma característica, en este giro aparece un motivo de unión cuya secuencia consenso es GXGXXG (Hanukoglu y Gutfinger, 1989; Kleiger y Eisenberg, 2002; White *et al.*, 2000) en el que las dos primeras glicinas participan en la unión de NAD(P) mientras que la tercera facilita el empaquetamiento entre la lámina β y la hélice α . Típicamente, algunas proteínas de esta familia, además del dominio de unión de NAD, presentan un segundo dominio que es el responsable de la unión específica del sustrato y de la subsiguiente catálisis enzimática.

La **Figura 34** que muestra los dominios conservados en Lp_3125 (**Figura 34B**) también muestra que la proteína Lp_1425 presenta también el dominio de unión a NAD(P)H/NAD(P)⁺ con plegamiento de Rossmann (**Figura 34A**). Un alineamiento de ambas proteínas refleja la alta similitud existente entre el dominio C-terminal de la proteína Lp_1425 y la proteína Lp_3125, también se señala la situación del patrón de unión GXGXXG en ambas proteínas (**Figura 35**). La **Figura 36** muestra una representación esquemática de la organización modular de la proteína Lp_3125 y su comparación con las proteínas Lp_1424 y Lp_1425. En la proteína Lp_3125 se muestra el dominio de unión a FAD así como el posible dominio de unión a sustrato.

```

Lp_3125 -----
Lp_1425 MKFVGVGTNAQHSYNRMLLEFMQRHFATQAEIEILELTDVPMFDESNDQTDSTIIQNFA

Lp_3125 -----
Lp_1425 TKIATADGVIIASPEHNHNSVPSALKSII EWLSFKIHPLDGQAVMIVGASYSVQGSSRAQL

Lp_3125 -----
Lp_1425 HLRQILDAPGVNASVMPGSEFLLGRAQTAFDDQGNLKVQGTVDFLDSCFAKFQKFATIVA

Lp_3125 -----
Lp_1425 EMRAPEALSFAPGTQVTATGHNGELPMRVTL SADRIENIEIDTSSETQGIADVAFERIP

Lp_3125 -----MTLAKHDS
Lp_1425 KEIIAGQTLAVDAISGASITSHGVIDGVARAVKEAGANPDDLKKRRATKQVAPAVKEVT
                                     .*. :

Lp_3125 YDIVVVGTGAAGTAAALEAAQH GASVLLLEKGRHTGGSSNYTEGLFA-----
Lp_1425 TDVVVVGAGGAGMTAAAKVLQAGHQAVVLEKFFAVGGNTVRAGGPMNAADPDWQRQFAAL
      *.***:*.** :** :. * * ..:*** .**.: : * :

Lp_3125 -----VDSYLQKAQNINVS--ATDVLK-----
Lp_1425 PGKQTLKDLSEDESTIAPEYRADFRKLKQIDAYLTANTNQKGLTFLDSTLLHRIQTYL
                                     :*:** * : : :*:

Lp_3125 ----EEVDYSKYRADSRIRRYLDD SANTVQWLKDQGV EYEGVQAMGAGEATWHIYK-GM
Lp_1425 GGQRTDLNGQEIHQYDLVKELTDNALDSVKWLQSIGVKFDESQVTMPVGAIWRRGHKPM
      ::: .: .: : : :. *:: :*:**:. **::: * . * *: : *

Lp_3125 GQAVL--HDALQPQAQKLGVLLTSTAITLHQATDGAITGVMIQSAATNETQVINTAAV
Lp_1425 GDLGFAYIKTLRAFVEQGGTIMTE-TPVKELLVTDGQVRGVIATN-AAHEKVI VHADAV
      *: : .*: .: * :*: * .. .*** : ** . **: . : : **

Lp_3125 ILATGGYLNNPDMMQKLTHYDTR---LIPVSSGKGTGDGLRLAWQAGAQQYGTGMAMLF
Lp_1425 ILASGGFAANTKMLQKYN TYWTAIDDDVKTTNSPAMTGDGIRLGTSGAALVGMGFSQMM
      ***:**: * .*: * . * * : ..* ***:**. .** * *: : :

Lp_3125 GGYLKDPSSEPSFKYMASQMETAAGQQPLLWLNEHGERFVDEAVVYNFSYAGNALYTQNQV
Lp_1425 PV-----SDPETGELFSGLQ--VPPANFVMVNQQGRFVNEYGSRDEL--TQAAIDNGSL
      *:* . : * : : . : : :*:**:* : : * : : :

Lp_3125 FSILDQGVINKMAQDGNFMGLGVYVRGEKMTKLQAEIDAAVAANKPFIFKANTIEALAT
Lp_1425 FYLIADDEIKKT-----AYNTTQAKIDQQA--NGTLFRADTLTDLAQ
      * : : . *:* .. **:* ** : :*:** **

Lp_3125 KMHLFPVDQVTHSIQTYNQYCDNGQDDDFGKNPEYLVKVSQGPFGFELNVGAFCTMGGLK
Lp_1425 QIGMDPAALTCTIADYNRYVDAGEDPEFHKT-AFDLKVAVAPFYATPRKPATHTHTMGGLK
      : : :*:** **:* * *: * * . : **: .***. : .. *****

Lp_3125 VTTNNEVLDTTGQPITGLYAAGNDAAGLTGDTYGPNMPTGCVGYAFYSGRNSGRHAAQYT
Lp_1425 IDS DAHVLNTDGQVIDGLYAAGEVAGGIHAG---NRLGGNSLS DIFTFGRIAAAHAVA EH
      : : .**:* ** * *****: *:* .. .: *... * ** :. **.

Lp_3125 HQQSIVSH
Lp_1425 -VDPVTA-
      : : :

```

Figura 35. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína Lp_3125 y Lp_1425 de *L. plantarum* WCFS1 anotadas como subunidad flavoproteína de fumarato reductasas. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa Clustal Omega. Se indica (*) identidad entre aminoácidos; (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Se resalta en amarillo el patrón consenso de unión a NAD(P).

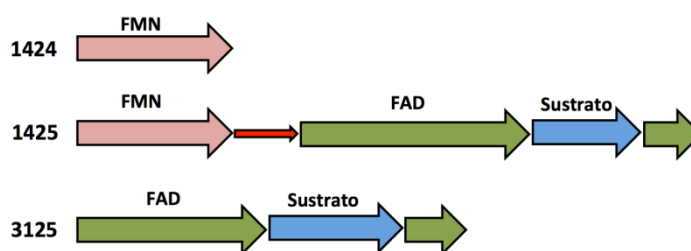


Figura 36. Representación esquemática de la estructura modular de las proteínas Lp_1424, Lp_1425 y Lp_3125. Se señala el módulo N-terminal de unión a FMN (color rosa) y el fragmento C-terminal de unión a FAD (color verde) así como el módulo de unión a sustrato (color azul).

Puesto que la proteína Lp_3125 está anotada como reductasa, y que la interrupción del gen que la codifica provoca que *L. plantarum* pierda su capacidad para reducir 4-vinilfenol, se decidió clonar el gen para producir y caracterizar bioquímicamente la proteína. Al igual que para la clonación de los genes *lp_1425* y *lp_1424*, el plásmido de clonaje inicial fue pURI3-Cter, que permite la producción de la proteína recombinante con una cola de seis residuos de histidina en su extremo carboxilo terminal. Se diseñaron los oligonucleótidos 1516 y 1517 para amplificar el gen *lp_3125* añadiendo en sus extremos 5' nucleótidos capaces de hibridar con el vector pURI3-Cter. Para clonar el gen se utilizó la misma estrategia de clonación independiente de ligación utilizada en apartados anteriores (de las Rivas *et al.*, 2007). El plásmido recombinante pURI3-Cter-3125 se transformó en la cepa *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21(DE3) para la hiperproducción de la proteína Lp_3125 recombinante. Inicialmente, los cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido recombinante pURI3-Cter-3125 se cultivaron en medio LB y cuando alcanzaron una DO_{600nm} de 0.6 se indujeron con 0,4 mM de IPTG. Al ensayar diversas condiciones de inducción se comprobó que la proteína Lp_3125 se producía insoluble, como cuerpos de inclusión. Para evitar la formación de cuerpos de inclusión se utilizó nuevamente la estrategia descrita por Ackerley *et al.* (2004) en la que las células de *E. coli* se cultivan a 22 °C

durante 5 días en medio LB conteniendo 1 M de sorbitol, 2,5 mM de betaína y se indujeron con 2,5 mM IPTG desde el inicio de la incubación. En estas condiciones de cultivo e inducción se comprobó que el extracto soluble de *E. coli* BL21 (DE3) transformado con el plásmido pURI3-Cter-3125 presentaba una proteína de aproximadamente 53 kDa ausente en el extracto procedente de *E. coli* BL21 (DE3). Al igual que en apartados anteriores de esta tesis, con objeto de comprobar, de manera preliminar, la actividad reductasa de 4-vinilfenol de la proteína Lp_3125 recombinante, los extractos solubles obtenidos a partir de los cultivos de *E. coli* BL21(DE3) (pURI3-Cter) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3125) se incubaron directamente en presencia de 4-vinilfenol (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se extrajeron con acetato de etilo los compuestos fenólicos presentes en la reacción y se analizaron mediante HPLC. Los extractos de *E. coli* que contenían la proteína Lp_3125 eran capaces de reducir todo el 4-vinilfenol presente en la reacción y convertirlo en 4-etilfenol (**Figura 37**). Por el contrario, los extractos de *E.coli* no fueron capaces de reducir el 4-vinilfenol presente (**Figura 37**).

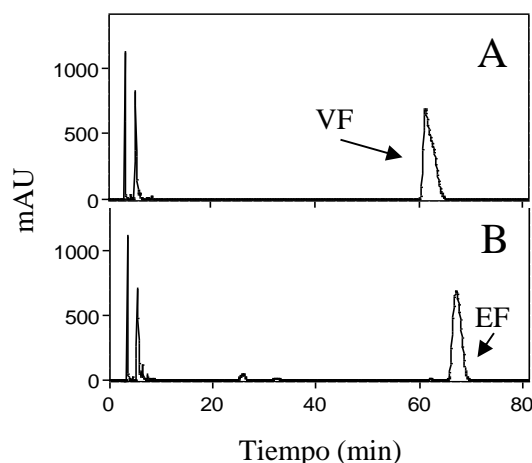


Figura 37. Reducción de 4-vinilfenol (1,5 mM) mediante extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) (A) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3125) (B). La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 37 °C durante 16 horas. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. VF, 4-vinilfenol; 3-HPPA; EF, 4-etilfenol.

Los extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3125) con actividad reductasa de 4-vinilfenol se sometieron a una cromatografía de afinidad a cobalto para purificar la proteína Lp_3125 presente. Una vez unida la proteína a la resina, ésta se eluyó de la misma mediante un gradiente de imidazol. Las fracciones que contenían la proteína pura se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-PAGE para comprobar la hiperproducción de la proteína Lp_3125 recombinante. En la **Figura 38** se observa la presencia de una proteína con un tamaño aproximado de 53 kDa tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-Cter-3125 como en las fracciones eluidas de la resina de afinidad. Con objeto de eliminar el imidazol presente, la proteína eluida se dializó frente a 50 mM tampón fosfato sódico, pH 7,0 conteniendo 300 mM de NaCl y 10% de glicerol. Mediante este protocolo se obtuvo 16 mg de proteína por litro de cultivo.

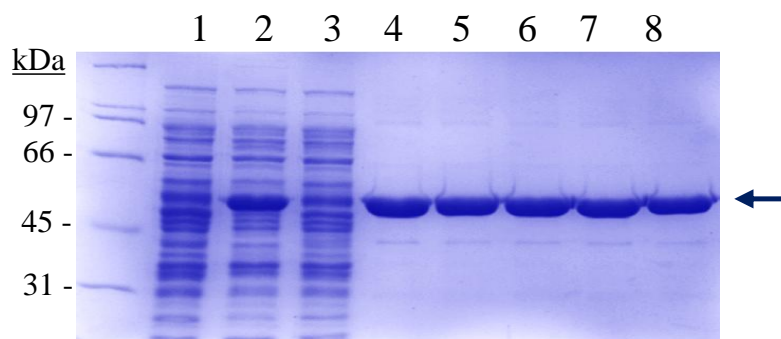


Figura 38. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_3125 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG; 2, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3125) inducidas con IPTG; 3, fracción eluida no retenida en la resina de afinidad; 4-8, fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

2.1.5. Actividad reductasa de 4-vinilfenol en la proteína Lp_3125

En el apartado anterior se ha comprobado que extractos de *E. coli* conteniendo la proteína Lp_3125 recombinante son capaces de reducir el 4-vinilfenol presente en el medio de cultivo. Con objeto de conocer si la proteína Lp_3125 pura y dializada en presencia de cofactores presenta la misma actividad se llevaron a cabo diferentes reacciones enzimáticas en función de los cofactores añadidos.

La proteína Lp_3125 está anotada como proteína con dominio de unión a FAD y de unión a NAD(P)H/NAD(P)⁺ que posee el plegamiento de Rossmann. La presencia de dominios de unión a diferentes cofactores o compuestos hace necesario añadirlos exógenamente para que transcurra la reacción. Por ello se realizó una batería de reacciones utilizando 10 o 100 µg de la proteína Lp_3125 pura y diferentes combinaciones de cofactores. Se llevaron a cabo reacciones añadiendo 500 µM NADH sólo o añadiéndole 250 µM FAD, y reacciones equivalentes pero sustituyendo NADH por NADPH. Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7 con 10% glicerol, y en presencia 4-vinilfenol (1,5 mM) durante 16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación los productos de la reacción se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Sorprendentemente, la proteína Lp_3125 pura no presentó actividad en ninguna de las condiciones ensayadas. La **Figura 39** muestra la reacción conteniendo 500 µM NADH y 250 µM FAD.

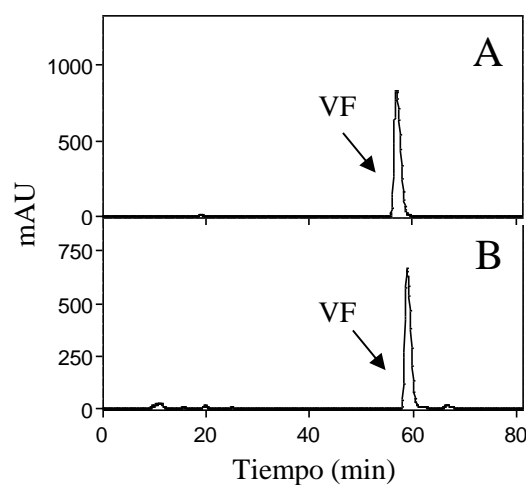


Figura 39. Reducción de 4-vinilfenol (1,5 mM) mediante la proteína Lp_3125 recombinante pura. La reacción se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7 con 10% glicerol conteniendo 500 μ M NADH y 250 μ M FAD, a 37 °C durante 16 horas sin proteína Lp_3125 (A) o conteniendo 100 μ g de proteína Lp_3125 pura (B). UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. VF, 4-vinilfenol.

Al igual que ocurría con la proteína Lp_1425 pura, los resultados obtenidos sugieren que el proceso de purificación y posterior diálisis de la proteína ha ocasionado la inactivación de la enzima o bien que la proteína Lp_3125 pura necesita un cofactor adicional para su actividad *in vitro*. Aunque no se puede descartar que la falta de actividad sea debida a que ambas proteínas son poco estables en solución, el hecho de que la actividad *in vitro* de estas proteínas puras sea nula parece sugerir que la falta de actividad es debida a las condiciones de la reacción.

2.2. Identificación de sustratos de la reductasa Lp_3125

Aunque no se ha podido demostrar actividad *in vitro* con la proteína pura, los resultados obtenidos mediante la interrupción del gen *lp_3125* en *L. plantarum* y la actividad reductasa que presentan las cepas de *E. coli* que expresan dicho gen, claramente demuestran que la proteína Lp_3125 es la reductasa responsable de la reducción de 4-vinilfenol a 4-etilfenol. Por ello, se estudió la actividad reductasa de la proteína Lp_3125 en extractos de *E. coli* sobre otros vinil fenoles. Se ha descrito que cultivos de *L. plantarum* producen etil y vinil derivados de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico (Rodríguez *et al.*, 2008b). Por ello se estudió la capacidad de la proteína Lp_3125 para reducir los vinil fenoles derivados del ácido *p*-cumárico (4-vinilfenol), ácido cafeico (4-vinilcatecol) y ácido ferúlico (4-vinilguayacol) a sus correspondientes etil derivados (4-etilfenol, 4-etilcatecol y 4-etilguayacol) (**Figura 40**). Puesto que el compuesto 4-vinilcatecol no se encontró disponible comercialmente se decidió sintetizarlo mediante la enzima PAD (descarboxilasa de ácidos fenólicos o Lp_3665).

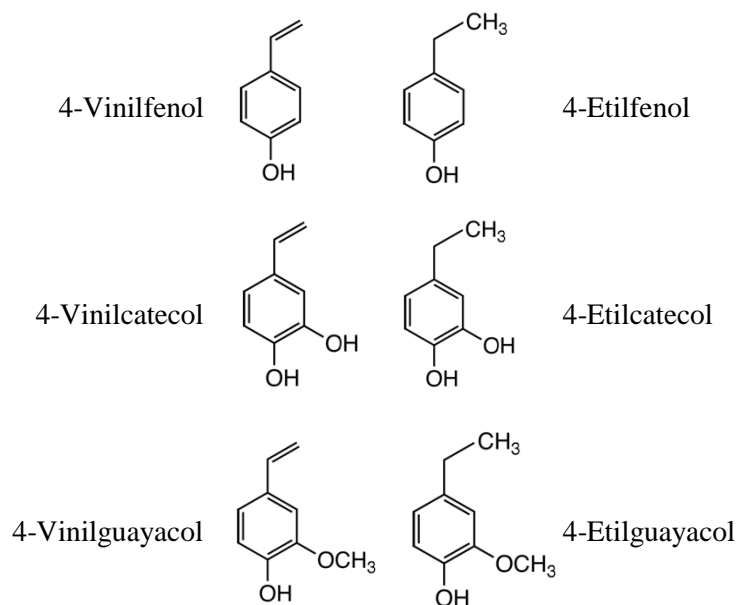


Figura 40. Representación esquemática de las estructuras de algunos vinil fenoles (4-vinilfenol, 4-vinilcatecol y 4-vinilguayacol) y sus correspondientes etil derivados (4-etilfenol, 4-etilcatecol y 4-etilguayacol).

La enzima PAD de *L. plantarum* es capaz de descarboxilar los ácidos hidroxicinámicos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico en sus correspondientes vinil derivados (4-vinilfenol, 4-vinilcatecol y 4-vinilguayacol) (Rodríguez *et al.*, 2008b). Cultivos de *E. coli* que hiperproducen esta enzima se han utilizado con éxito para la producción de vinil derivados a partir de hidrolizados alcalinos de mazorcas de maíz (Salgado *et al.*, 2012, 2014). Por ello, se realizaron cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pURI3-Cter-PAD los cuales se incubaron a 22 °C durante 48 horas en presencia de ácido cafeico 3 mM. En estas condiciones *E. coli* produce la proteína PAD recombinante de *L. plantarum* y el ácido cafeico presente en el medio de cultivo lo transforma en 4-vinilcatecol. El 4-vinilcatecol producido se recuperó del medio de cultivo mediante dos extracciones con acetato de etilo y se analizó mediante HPLC. La **Figura 41A** muestra el 4-vinilcatecol producido por la cepa de *E. coli* recombinante. Este último se identificó mediante su espectro de absorción que se comparó con el obtenido previamente el cual fue identificado mediante su ion molecular [M-H] m/z 135 (Rodríguez *et al.*, 2008b) (**Figura 41B**).

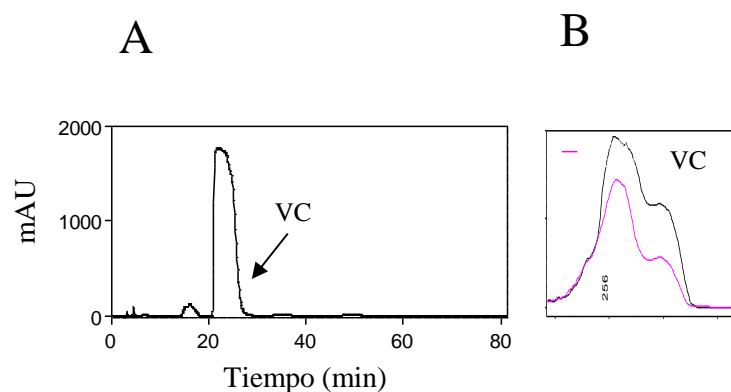


Figura 41. Producción de 4-vinilcatecol mediante el cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-PAD) crecido a 22 °C durante 48 horas en medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y 3 mM de ácido cafeico (A). El cromatograma se registró a 280 nm. (B) Comparación entre el espectro de absorción del compuesto producido (rojo) y el estándar identificado previamente mediante espectrometría de masas (negro).

Una vez se dispuso del vinil derivado del ácido cafeico (4-vinilcatecol) se llevó a cabo el estudio para conocer algunos de los sustratos que la proteína Lp_3125 es capaz de reducir. Para ello, extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3125) que hiperproducen la proteína Lp_3125 se incubaron en presencia de 4-vinilcatecol, 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol (**Figura 42**). Los resultados obtenidos demuestran que la proteína Lp_3125 es la responsable de la reducción de los tres vinil derivados ensayados puesto que a partir de ellos se obtuvo 4-etilcatecol, 4-etilfenol y 4-etilguayacol, respectivamente (**Figura 42**). Los compuestos obtenidos se identificaron mediante la comparación de su tiempo de retención y espectro de absorción, determinado mediante un detector de diodos, con el tiempo de retención y espectro de los correspondientes compuestos comerciales, 4-etilfenol, 4-etilcatecol o 4-etilguayacol.

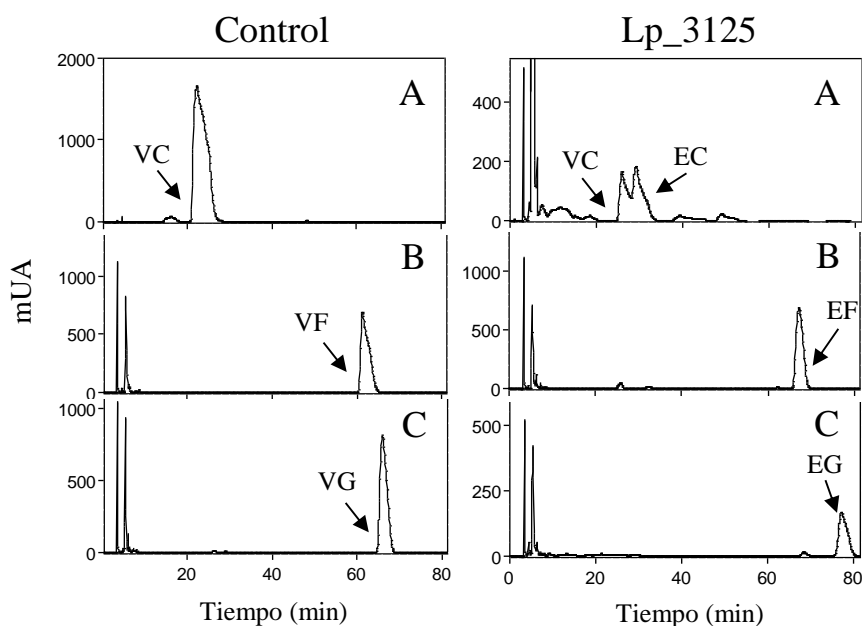


Figura 42. Reducción de vinil fenoles mediante extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3) (Control) y *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3125) (Lp_3125). Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 37 °C durante 16 horas. Los vinil fenoles analizados fueron 4-vinilcatecol (A), 4-vinilfenol (B) y 4-vinilguayacol (C). UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. VC, 4-vinilcatecol; VF, 4-vinilfenol; VG, 4-vinilguayacol; EC, 4-etilcatecol; EF, 4-etilfenol; EG, 4-etilguayacol.

Al igual que en el caso de la proteína Lp_1425, reductasa de ácidos hidroxicinámicos, hasta la realización de esta tesis no existía información genética sobre la proteína de *L. plantarum* responsable de la reducción de vinil fenoles. Estudios realizados en bacterias lácticas sólo han descrito que algunas cepas de las especies *L. plantarum*, *Lactobacillus collinoides* y *L. rossiae* presentan esta actividad bioquímica (Cavin *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 2008a; Filannino *et al.*, 2014) pero no se han realizado estudios para conocer la proteína responsable de dicha actividad. Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido identificar por primera vez una enzima bacteriana con actividad reductasa de vinil fenoles.

2.3. Inducción de la actividad reductasa de vinil fenoles

Del estudio transcripcional de la región en donde se localiza el gen *lp_3125* se deduce que este gen se transcribe solo, mediante un ARN monocistrónico, y que divergente a él se transcribe un posible activador transcripcional (*Lp_3124*) cuya ausencia ocasiona la pérdida de actividad vinilfenol reductasa. Estos resultados indican que ambos genes están implicados en la reducción de vinil fenoles por lo que se decidió conocer su respuesta de los genes *lp_3124* y *lp_3125* frente a la presencia de posibles sustratos como son 4-vinilfenol, 4-vinilcatecol y 4-vinilguayacol, además de su respuesta frente a ácido *p*-cumárico, como compuesto de estructura relacionada. Sin embargo, se decidió no realizar los cultivos en presencia de 4-vinilcatecol y 4-vinilguayacol. Como se ha comentado anteriormente, no se ha conseguido disponer de 4-vinilcatecol comercial por lo que para el estudio de su reducción por *Lp_3125* se ha sintetizado mediante cultivos de *E. coli* recombinantes. Puesto que no se ha podido determinar el grado de pureza ni la concentración del 4-vinilcatecol así obtenido se optó no utilizarlo para el estudio de la expresión por las dudas que podrían surgir en la interpretación de los resultados obtenidos. Tampoco se realizó el estudio de la expresión génica en presencia de 4-vinilguayacol,

porque, a pesar de estar disponible comercialmente, no se conseguía una adecuada disolución en el medio de cultivo durante los 10 minutos de inducción utilizados en el experimento. Por todo ello, sólo se analizó la expresión en presencia de dos compuestos, 4-vinilfenol y ácido *p*-cumárico.

Para el estudio de la actividad reductasa se realizaron cultivos de *L. plantarum* WCFS1 que se expusieron durante 10 min a la presencia de 1,5 mM de 4-vinilfenol o de ácido *p*-cumárico. A partir de estos cultivos se extrajo el ARN, se trató con DNasa y mediante la enzima retrotranscriptasa se sintetizó el correspondiente ADNc. Se amplificaron regiones internas de los genes *lp_3124* y *lp_3125* mediante los oligonucleótidos 1719+1720 (amplifican 54 pb de *lp_3124*) y 1470+1471 (amplifican 62 pb del gen *lp_3125*). Después de validar los oligonucleótidos, se analizó el cambio en la expresión relativa de los genes *lp_3124* y *lp_3125* respecto al nivel de transcripción de los mismos en el ADNc obtenido de cultivos en ausencia de compuesto fenólico.

Los datos obtenidos mostraron la inducción del gen *lp_3125* tanto en presencia de su sustrato (4-vinilfenol), como en presencia de su correspondiente ácido hidroxicinámico (ácido *p*-cumárico) (**Figura 40**). La inducción de este gen mediante ácido *p*-cumárico ya se describió anteriormente por Reverón *et al.* (2012) en un estudio transcriptómico global de respuesta a la presencia de este ácido a una concentración de 1,5 mM, la misma que la utilizada en este estudio. Reverón *et al.* (2012) describieron una inducción de 4 veces y, aunque en este estudio se ha observado una inducción de sólo 2,3 veces, hay que tener en cuenta que los abordajes experimentales son distintos por lo tanto el valor absoluto de la inducción observada puede variar en ambos estudios. La presencia de 4-vinilfenol induce un aumento mayor (3,3 veces) en la expresión del gen *lp_3125*. Tanto los resultados obtenidos previamente como los obtenidos en este estudio indican que el gen *lp_3125* es un gen inducible.

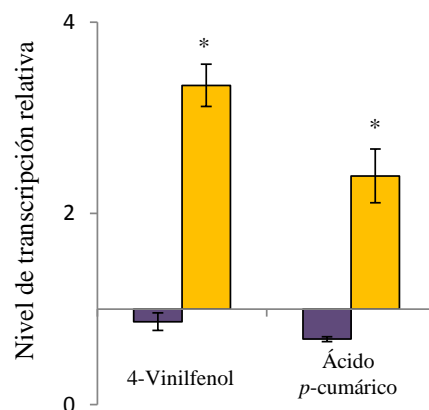


Figura 43. Análisis de la expresión relativa de los genes *lp_3124* y *lp_3125* en *L. plantarum* WCFS1 mediante RT-qPCR en presencia de 1,5 mM 4-vinilfenol o ácido *p*-cumárico. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes. Las barras representan la transcripción relativa de los genes *lp_3124* (morado) y *lp_3125* (naranja). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas en comparación con la muestra control sin tratar (test *t* de Student de dos colas, *, $p < 0,05$)

Al igual que lo que ocurría en el regulador transcripcional implicado en la reducción de ácidos hidroxicinámicos (*Lp_1422*), en las condiciones analizadas no se observa inducción del gen *lp_3124*, que codifica un regulador transcripcional. El ARN se extrajo después de 10 minutos de exposición al compuesto fenólico, por lo que una posible explicación puede ser que se trate de genes de expresión temprana, cuya inducción se produciría a tiempos más cortos y una vez producida la correspondiente proteína, no sería necesario continuar su expresión. Se trata de reguladores de tipo LysR que se ha descrito que son autorregulables por lo que la presencia de la proteína reguladora puede provocar una regulación negativa de su expresión (Lochowska *et al.*, 2001; Lönneborg y Brzezinski, 2011).

2.4. Actividad reductasa de vinil fenoles en otras bacterias lácticas

La capacidad para reducir vinil fenoles es una actividad poco frecuente entre bacterias lácticas (Filannino *et al.*, 2014). Puesto que en esta tesis se ha demostrado que la presencia de la proteína *Lp_3125* confiere la capacidad para reducir vinil fenoles a *L. plantarum* WCFS1, se decidió conocer la presencia de

proteína similares en otras bacterias lácticas. Para ello se realizó una búsqueda de proteínas similares entre las proteínas incluidas en las bases de datos. Al igual que lo que ocurría con Lp_1425, la búsqueda reveló que sólo existen proteínas con una identidad superior al 35% en especies del género *Lactobacillus*. Por ello, parece que la presencia de proteínas similares a Lp_3125 es exclusiva de *Lactobacillus*. Esto no implica que las todas las proteínas similares presentes en este género posean actividad de vinilfenol reductasa, de la misma manera no se puede excluir que haya proteínas no semejantes que compartan su actividad bioquímica. Proteínas similares a Lp_3125 no sólo están restringidas al género *Lactobacillus*, si no que dentro de este género sólo están presentes en un reducido número de especies, la mayoría pertenecientes al grupo *L. plantarum*. Se han encontrado proteínas de 476 a 492 residuos de aminoácidos que presentan una identidad del 43 al 89% con la proteína Lp_3125 de *L. plantarum* WCFS1. Las proteínas pertenecen a las especies *L. pentosus*, *L. paraplantarum*, *L. bifementans*, *L. collinoides*, *L. paracollinoides*, *L. similis* y *L. rossiae*.

Con las proteínas similares a Lp_3125 identificadas en las especies de *Lactobacillus* se realizó un alineamiento utilizando el programa Clustal Omega. Comparando las secuencias se puede comprobar que las proteínas analizadas presentan similitud a lo largo de toda la proteína pudiéndose identificar motivos de aminoácidos conservados en todas ellas, incluyendo las tres glicinas del motivo de Rossmann (**Figura 44**). Se seleccionaron dos de estos motivos para diseñar oligonucleótidos degenerados y utilizarlos para la detección de los genes que codifican estas proteínas. Los oligonucleótidos 1657 (codifica D(I/V/L)VVG, posición 10 de Lp_1425) y 1658 (codifica GLYAAG, posición 447 de Lp_3125) amplifican un tamaño de 1311 pb del gen Lp_3125. Los oligonucleótidos 1657+1658 se utilizaron con el ADN extraído de las 47 cepas de bacterias lácticas analizadas en apartados anteriores para amplificar, mediante PCR, los genes que codifican proteínas similares a Lp_3125.

1657

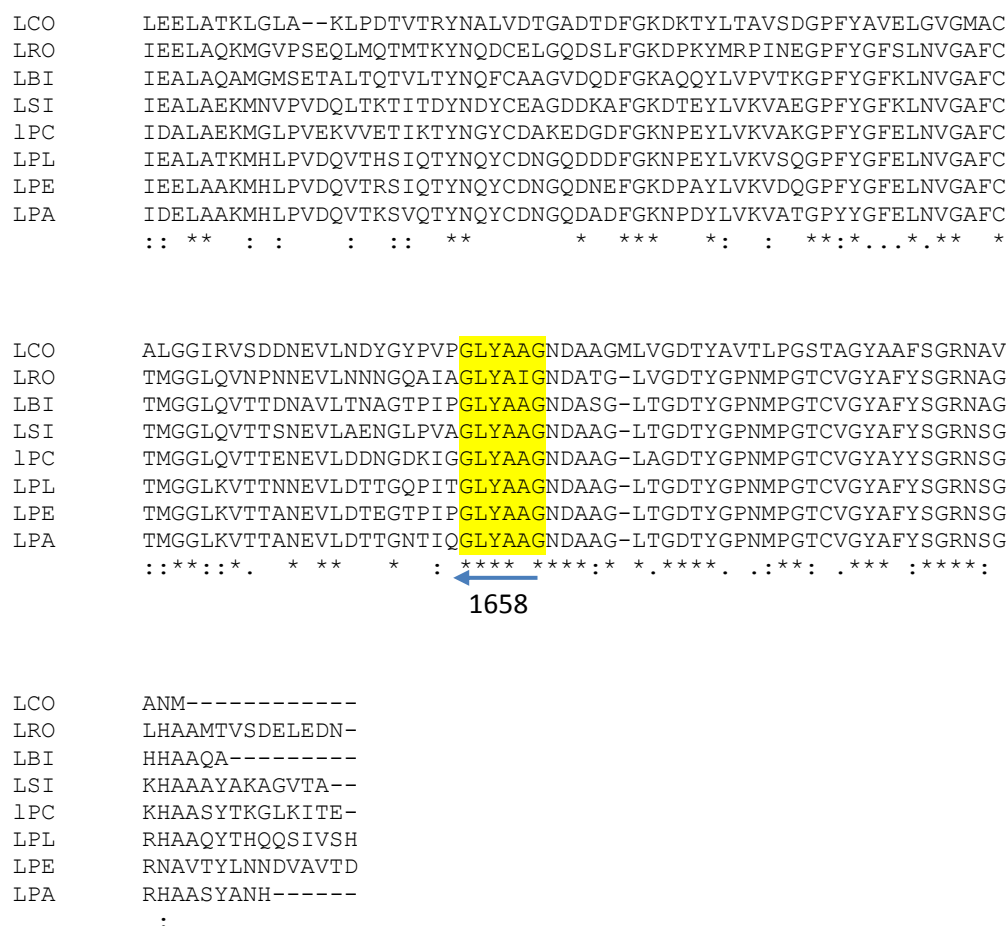


Figura 44. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Lp₃₁₂₅ con proteínas similares presentes en las bases de datos. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal Omega a partir de las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. Las secuencias de aminoácidos pertenecen a *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (LPL) (F9USN6), *L. paraplantarum* DSM 10667 (LPA) (A0A0R1RBK3), *L. pentosus* DSM 10667 (LPE) (A0A0R1FK87), *L. collinoides* DSM 20515 (LCO) (A0A0R2BBL2), *L. paracollinoides* DSM 15502 (LPC) (A0A0R1T9H1), *L. bif fermentans* DSM 20003 (LBI) (A0A0R16M13), *L. similis* DSM 23365 (LSI) /A0A0R2F9E3) y *L. rossiae* DSM 15814 (LRO) (A0A0R1RHT0). Identidad entre aminoácidos (*), cambio no conservativo (:) y cambio conservativo (.) . La secuencia codificada por los oligonucleótidos 1657 y 1658 se indica marcada en amarillo y con flechas. El motivo GXGXXG del plegamiento de Rossmann está señalado en verde.

De las cepas analizadas sólo amplificaron un fragmento del tamaño esperado (1,3 kb) las cepas de las especies pertenecientes al grupo *L. plantarum*, es decir, las cepas de las especies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus* (**Figura 45**). Por el contrario, con ninguna cepa de las otras especies de bacterias lácticas se obtuvo una amplificación positiva. Al igual que lo que

ocurría con la presencia del gen *lp_1425*, los resultados obtenidos en esta tesis indican que todas las cepas analizadas del grupo *L. plantarum* poseen el gen que codifica la enzima responsable de la reducción de 4-vinilfenol. Sin embargo, al realizar una búsqueda en las bases de datos entre 25 cepas del grupo *L. plantarum* cuyo genoma se ha secuenciado completamente, no se consiguió localizar una proteína similar a Lp_3125 en las cepas DOMLA, CMPG5300, 2165 y EGD-AQY (datos no mostrados). Este resultado negativo no implica que definitivamente estas cepas no tengan la proteína puesto que puede existir algún error o cambio de fase en la lectura del genoma y no haberse identificado el gen correctamente. Aunque la ausencia del gen o la interrupción del mismo en estas cepas tampoco se puede descartar. Puesto que no se dispone de las cepas de *L. plantarum* DOMLA, CMPG5300, 2165 y EGD-AQY no se pudo comprobar mediante PCR la presencia del gen equivalente a *lp_3125* o bien demostrar su capacidad para reducir 4-vinilfenol.



Figura 45. Amplificación mediante PCR de genes que codifican proteínas similares a Lp_3125 en bacterias lácticas. La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos 1657 y 1658 y el ADN cromosómico de las cepas *Enterococcus casseliflavus* DSM 20680 (1), *E. durans* DSM 20633 (2), *E. faecalis* DSM 20478 (3), *E. faecium* CECT 4102 (4), *E. gallinarum* DSM 24841 (5), *E. hirae* DSM 20160 (6), *L. brevis* CECT 5354 (7), *L. fermentum* CECT 4007 (8), *L. fructivorans* CECT 4785 (9), *L. paraplantarum* DSM 10641 (10), *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* DSM 16365 (11), *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917 (CECT 748) (12), *L. plantarum* DSM 10492 (13), *L. pentosus* DSM 16366 (14), *L. sakei* subsp. *carneus* DSM 15831 (15), *Leuconostoc citreum* CECT 4025 (16), y *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (17). Algunos fragmentos del marcador de peso molecular λ EcoT14I (Takara) están representados en la izquierda.

En las 47 cepas de bacterias lácticas en las que se estudió la presencia o ausencia del gen *lp_3125*, se analizó también su capacidad para transformar 4-vinilfenol. Para ello las cepas de bacterias lácticas se cultivaron en el medio MRS o BHI conteniendo 1,5 mM de 4-vinilfenol a 30 °C durante cinco días. Después de la incubación, los compuestos fenólicos presentes en los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC. Tal como refleja la **Figura 46**, todas las cepas que amplificaron el fragmento de 1,3 kb del gen *lp_3125*, fueron capaces, en mayor o menor medida, de reducir el 4-vinilfenol presente en el medio de cultivo. Sin embargo, las cepas que no amplificaron el gen no fueron capaces de reducir el 4-vinilfenol presente (**Tabla 6**).

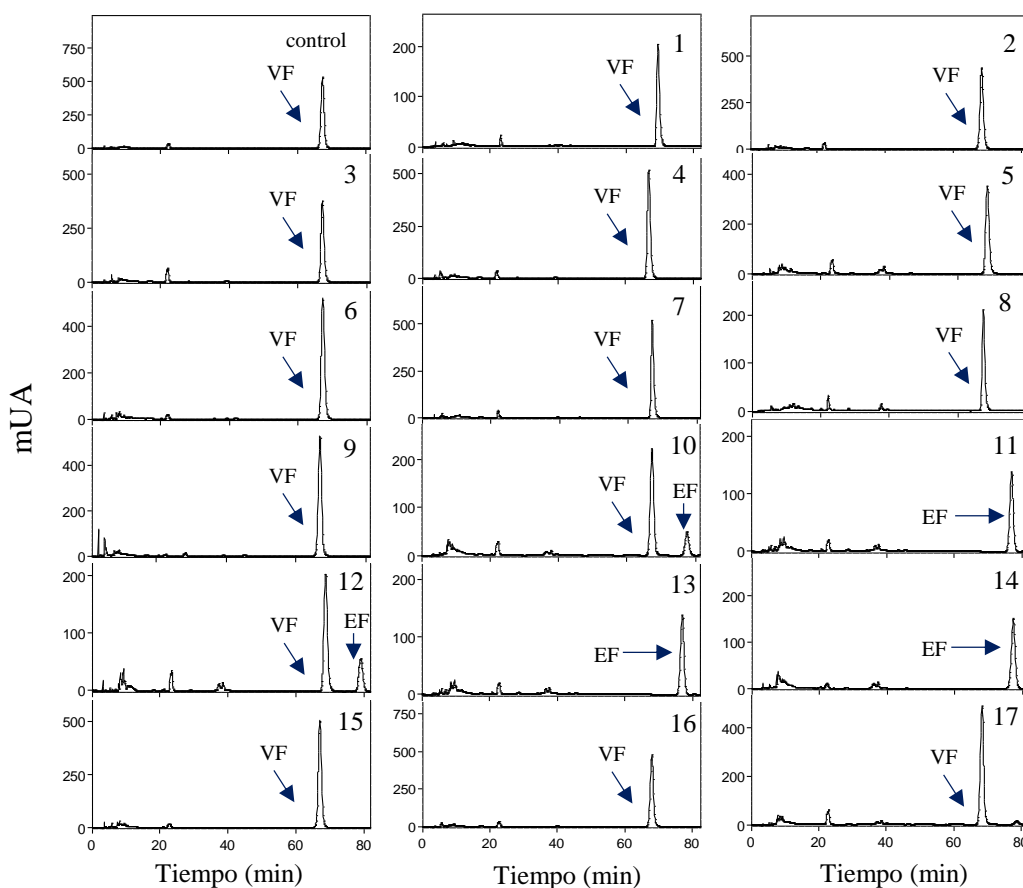


Figura 46. Reducción de 4-vinilfenol en cultivos de *Enterococcus casseliflavus* DSM 20680 (1), *E. durans* DSM 20633 (2), *E. faecalis* DSM 20478 (3), *E. faecium* CECT 4102 (4), *E. gallinarum* DSM 24841 (5), *E. hirae* DSM 20160 (6), *Lactobacillus brevis* CECT 5354 (7), *L. fermentum* CECT 4007 (8), *L. fructivorans* CECT 4785 (9), *L. paraplantarum* DSM 10641 (10), *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* DSM 16365 (11), *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917 (CECT 748) (12), *L. plantarum* DSM 10492 (13), *L. pentosus* DSM 16366 (14), *L. sakei* subsp. *carneus* DSM 15831 (15), *Leuconostoc citreum* CECT 4025 (16), y *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (17). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 30 °C en medio MRS conteniendo 4-vinilfenol a una concentración de 1,5 mM. UA, Unidades de absorbancia. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. VF, 4-vinilfenol; EF, 4-etilfenol.

Tabla 6. Reducción de 4-vinilfenol en bacterias lácticas

Especie	Cepa	Vinilfenol	
		HPLC	PCR
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSM 20680	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	DSM 20633	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20478	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4102	-	-
	DSM 20477	-	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	DSM 24841	-	-
<i>Enterococcus hirae</i>	DSM 20160	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 367 (CECT 5354)	-	-
	CECT 216	-	-
	CECT 4121	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 4007	-	-
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	CECT 4785	-	-
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10641 (ATCC 10776)	+	+
	DSM 10667 ^T (ATCC 10667 ^T)	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	+	+
	subsp. <i>argentoratensis</i> DSM 16365	+	+
	subsp. <i>plantarum</i> DSM 20174	+	+
	subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T (CECT 748 ^T)	+	+
	NC8	+	+
	CECT 220	+	+
	CECT 221	+	+
	CECT 223	+	+
	CECT 224	+	+
	CECT 749 (ATCC 10241)	+	+
	CECT 4645	+	+
	DSM 1055	+	+
	DSM 2648	+	+
	DSM 10492	+	+
	DSM 13273	+	+
	DSM 20246	+	+
	RM28	+	+
	RM31	+	+
	RM35	+	+
	RM38	+	+
	RM39	+	+
	RM40	+	+
	RM41	+	+
	RM71	+	+
	RM72	+	+
	RM73	+	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSM 16366	+	+
	DSM 20314	+	+
	DSM 20199	+	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	subsp. <i>carnosus</i> DSM 15831	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	CECT 4025	-	-
	CECT 4700	-	-
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	UCN34	-	-

Los fenoles volátiles, entre los que se encuentran los etil y vinil fenoles, son compuestos aromáticos, los cuales, por encima de ciertos niveles afectan negativamente al aroma de algunos alimentos fermentados. Por ello se han realizado numerosos estudios para conocer la capacidad que tienen las bacterias lácticas para producir estos compuestos. Los estudios realizados sugieren que aunque algunas especies de bacterias lácticas son capaces de descarboxilar los ácidos fenólicos a vinil fenoles, la capacidad para producir etil fenoles es mucho menos frecuente entre estas bacterias (Couto *et al.*, 2006). En los primeros estudios realizados se demostró mediante cromatografía de gases que algunas cepas de *L. plantarum*, *L. brevis* y *P. pentosaceus* después de una incubación de dos días en presencia de 500 mg/l de ácido *p*-cumárico o ácido ferúlico, producían 4-etilfenol o 4-etilguayacol (Cavin *et al.*, 1993). Sin embargo, en un estudio posterior, en el que además de las especies anteriores también se incluyeron cepas de las especies *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus damnosus* y *O. oeni*, se concluyó que aunque algunas de las bacterias lácticas analizadas en el estudio eran capaces de producir cantidades significativas de vinil fenoles en un vino modelo, *L. plantarum* fue la única bacteria capaz de producir cantidades significativas de etil fenoles (Chatonnet *et al.*, 1995). También se estudió la capacidad para producir etil fenoles en cepas de varias especies del género *Lactobacillus* (*L. buchneri*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. collinoides*, *L. confusus*, *L. curvatus*, *L. fructivorans*, *L. kéfir*, *L. mali*, *L. sakei*, y *L. viridescens*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. damnosus*, y *P. parvulus*) y *Lc. mesenteroides* (Couto *et al.*, 2006). Los resultados indicaron que aunque el 37% de las bacterias estudiadas fueron capaces de producir 4-vinilfenol a partir de ácido *p*-cumárico, la etapa posterior de reducción para producir 4-etilfenol sólo se encontró en cepas de las especies *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. collinoides*. La producción de vinil fenoles por *L. collinoides* a partir de ácido cafeico y ácido *p*-cumárico se confirmó posteriormente, no detectándose la producción de estos etil fenoles en cepas de las especies *L. brevis*, *L. mali* y *Lc. mesenteroides* (Buron *et al.*, 2011). Estudios realizados en tres cepas de *L. brevis* confirmaron la incapacidad de las mismas para reducir

los vinil fenoles que producen a partir de ácidos hidroxicinámicos (Curiel *et al.*, 2010). Finalmente, el estudio realizado por Filannino *et al.* (2014) también confirma que las cepas de *L. brevis* no producen etil fenoles, al igual que cepas de las especies *L. fermentum* y *Lc. mesenteroides*, y, en cambio, si detecta producción de etil fenoles en una cepa de *L. rossiae*. Por tanto, todos los estudios realizados parecen indicar que sólo un reducido número de especies de bacterias lácticas son capaces de reducir vinil fenoles a etil fenoles, entre las especies que poseen la enzima reductasa sólo estarían *L. plantarum*, *L. collinoides* y *L. rossiae*. Estos datos coinciden con los obtenidos en esta tesis puesto que sólo se ha detectado la capacidad para reducir vinil fenoles en cepas del grupo de *L. plantarum* (*L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*) y, aunque no se han ensayado cepas de las especies *L. collinoides* y *L. rossiae*, si se ha descrito en esta tesis que son de las pocas especies que poseen proteínas similares a Lp_3125 (**Figura 44**).

Estudios realizados en *L. plantarum* y *L. collinoides* han descrito que la transformación de 4-vinilfenol en 4-etilfenol puede suponer una ventaja para las bacterias que poseen esta actividad reductasa. Se ha demostrado que estas bacterias en altas concentraciones de glucosa producen casi exclusivamente 4-vinilfenol, mientras que en bajas concentraciones, sólo producen 4-etilfenol. Se ha descrito que parte de la glucosa se puede desviar para la producción de manitol, como ruta alternativa para regenerar NAD(P)^+ . Estos resultados se confirman con los resultados obtenidos con fructosa, compuesto que algunas bacterias utilizan como aceptor de electrones, y que se reduce a manitol. La reducción de 4-vinilfenol a 4-etilfenol se favorece claramente en anaerobiosis, lo que apoya la necesidad de aumentar la disponibilidad de NAD(P)^+ . Los datos disponibles sugieren que el metabolismo de estos compuestos en bacterias lácticas viene determinado por el balance $\text{NAD(P)}^+/\text{NADH(P)}$ (Silva *et al.*, 2011).



Conclusions

Conclusions

1. The disruption of reductase-encoding genes, which were induced in the presence of *p*-coumaric acid, confirmed their involvement on the reduction of hydroxycinnamic acids and vinyl phenols.
2. The presence of a functional Lp_1425 protein is required for the reduction of hydroxycinnamic acids.
3. In spite that a functional Lp_1424 protein is not needed for catalytic activity, this protein helps to Lp_1425 stabilization and avoids its proteolysis.
4. All the hydroxycinnamic acids assayed were reduced to their corresponding substituted phenyl propionic acids by the Lp_3125 protein.
5. In lactic acid bacteria, the presence of proteins similar to Lp_1425 is associated to the ability to reduce hydroxycinnamic acids.
6. In *L. plantarum* WCFS1, the capacity to reduce vinyl to ethyl phenols is due to the presence of a functional Lp_3125 protein.
7. The protein Lp_3125 is able to reduce different vinyl phenols to their corresponding ethyl phenols.
8. In lactic acid bacteria, the ability to reduce vinyl phenols is less frequent than the ability to reduce hydroxycinnamic acids.
9. The identification of Lp_1425 and Lp_3125 enzymes constitutes the first description of bacterial reductases showing activity on hydroxycinnamic acids and vinyl phenols, respectively.
10. The description of these reductases completes the identification of the enzymes involved on the metabolism of hydroxycinnamic acids in lactic acid bacteria.



Bibliografía

Bibliografía

- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Park, C. H., Blake, R., Keyhan, M. y Matin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 873-882.
- Alberto, M. R., Gómez-Cordovés, M. C. y Manca de Nadra, M. C. 2004. Metabolism of gallic acid and catequin by *Lactobacillus hilgardii* from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6465-6469.
- Andersen, Ø. y Markham, K. (2006). *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications* (Ø. Andersen y K. Markham Eds.): CRC Press/Taylor y Francis, Boca Raton.
- Armisen, P., Mateo, C., Cortés, E., Barredo, J.L., Salto, F., Diez, B., Rodes, L., García, J.L., Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J. M. (1999). Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. *Journal of Chromatography A*, 848, 61-70.
- Arrecubieta, C., García, E. y López, R. (1995). Sequence and transcriptional analysis of DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene*, 167, 1-6.
- Aukrust, T. y Blom, H. (1992). Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International*, 25, 253-261.
- Ayed, L. y Hamdi, M. 2002. Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Letters* 24, 1763-1765.

- Bartolomé, B., Peña-Neira, A., y Gómez-Cordovés, C. (2000). Phenolics and related substances in alcohol-free beers. *European Food Research and Technology*, 210, 419-423.
- Barthelmebs, L., Divies, C., y Cavin, J. F. (2000). Knockout of the *p*-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3368-3375.
- Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. y de Revel, G. (2007). Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria *Letters in Applied Microbiology*, 44, 62-67
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F. y Dellacassa, E. (2002). Effect of beta-glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2344-2349.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brennan, R. G. y Matthews, B. W. (1989). The helix-turn-helix DNA binding motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 1903-1906.

- Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Ledauphin, J., Guichard, H., Barillier, D. y Coton, E. (2011). Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. *Food Microbiology*, 28, 1243-1251.
- Caetano-Anollés, G., Kim, H. S. y Mittenenthal, J. E. (2007). The origin of modern metabolic networks inferred from phylogenomic analysis of protein architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 9358-9363.
- Caplice, E. y Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Cavin, J. F., Andioc, V., Etievant, P. X., y Divies, C. (1993). Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 76-80.
- Cavin, J. F., Barthelmebs, L., y Diviès, C. (1997a). Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1939-1944.
- Cavin, J. F., Barthelmebs, L., Guzzo, J., Van Beeumen, J., Samyn, B., Travers, J. F., y Diviès, C. (1997b). Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 147, 291-295.

- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N. y Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wine. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 165-178
- Chatonnet, P., Dubordieu, D., y Boidron, J. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 463-468.
- Chatonnet, P., Viala, C. y Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenol components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 463e468.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B. y Pozzi, N. (1994). Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4142–4147.
- Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R. y Hogg, T. A. (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 166-171.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., y Lewis, N. G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. In B. Buchanan, W. Gruissem y R. Jones (Eds.), *American Society of Plant Physiologists*. (pp. 1250-1318): Rockville, Maryland, USA.

- Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martínez-Alvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., López Rivas, C., Requena, T., Rodríguez, J.M. y Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolics acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 16, 372-382.
- Curiel, J. A., de las Rivas, B., Mancheño, J. M. y Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expression and Purification*, 76, 44-53.
- Curiel, J. A., Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry*, 120, 225-229.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 505-512.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., Gibbs, R.A., Csorgo, B., Posfai, G., Weinstock, G.M. y Blattner, F.R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190, 2597-2606.
- El-Seedi, H., El-Said, A., Khalifa, S., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.-K. y Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10877-10885.

- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Mancheño, J. M., De las Rivas, B. y Muñoz, R. (2013). Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5130-5136.
- Esteban-Torres, M., Barcenilla, J. M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014a). Characterization of a versatile arylesterase from *Lactobacillus plantarum* active on wine esters. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62, 5118-5125.
- Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014b). Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 97, 6737-6744.
- Esteban-Torres, M., Landete, J. M., Reverón, I., Santamaría, L., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2015). A *Lactobacillus plantarum* esterase active on a broad range of phenolic esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3235-3242.
- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Santamaría, L., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2016). The Lp_3561 and Lp_3562 enzymes support a functional divergence process in the lipase/esterase toolkit from *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1118-1127.
- Filannino, P., Gobbetti, M., De Angelis, M. y Di Cagno, R. (2014). Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 7574-7582.

- Fugelsang, K.C., Osborn, M.M. y Muller, C.J. (1993). *Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in winemaking. In: Gump, B.H. (Ed.), *Beer and Wine Production: Analysis, Characterization and Technological Advances*. Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 110-131.
- Green, M. L. y Karp, P. D. (2005). Genome annotation errors in pathway databases due to semantic ambiguity in partial EC numbers. *Nucleic Acids Research*, 33, 4035-4039.
- Guillén, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., Muñoz, R. y Herraiz, T. (2009). Characterization of a nitroreductase with selective nitroreduction properties in the food and intestinal lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10457-10465.
- Gury, J., Barthelmebs, L., Tran, N. P., Diviès, C. y Cavin, J. F. (2004). Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding *padA* gene of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2146-2153.
- Hammes, W., Schleifer, K. H. y Kandler, O. (1973). Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, 116, 1029- 1053.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-590.

- Hanukoglu, I. y Gutfinger, T. (1989). cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases *European Journal of Biochemistry*, 180, 479-484.
- Harborne, J. B. y Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M. y Teixeira de Mattosa, M. J. (2014). H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2229-2239.
- Iwamoto, K., Tsuruta, H., Nishitani, Y. y Osawa, R., (2008). Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (T). *Systematic and Applied Microbiology* 31, 269–277.
- Jiménez, N., Curiel, J. A., Reverón, I., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2013). Uncovering the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 gallate decarboxylase involved in tannin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 4253-4263.
- Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014a). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2991-2997.

- Jiménez, N., Reverón, I., Esteban-Torres, M., López de Felipe, F., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014b). Genetic and biochemical approaches towards unravelling the degradation of gallotannins by *Streptococcus gallolyticus*. *Microbial Cell Factories*, 13, 154-163
- Jiménez, N., Santamaría, L., Esteban-Torres, M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014c). Contribution of a tannase from *Atopobium parvulum* DSM 20469^T in the oral processing of food tannins. *Food Research International*, 62, 397-402.
- Kapur, C. y Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- Klaenhammer, T. R., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E. y Barrangou, R. (2007). Influence of the dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition*, 137, 748-750.
- Kleerebezem M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.R., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M. y Siezen, R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, 1990–1995.

- Kleiger, G. y Eisenberg, D. (2002). GXXXG and GXXXA Motifs Stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C α -H \cdots O hydrogen bonds and van der Waals Interactions. *Journal of Molecular Biology*, 323, 69-76.
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S. A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C. H. y Yakunin, A. F. (2005). Enzyme genomics: application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 263-279.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Landete, J.M., Rodríguez, H., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2007). High-added-value antioxidants obtained from the degradation of wine phenolics by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Protection*, 70, 2670-2675.
- Leer, R. J., Christiaens, H., Verstraete, W., Peters, L., Posno, M. y Pouwels, P. H. (1993). Gene disruption in *Lactobacillus plantarum* strain 80 by site-specific recombination: isolation of a mutant strain deficient in conjugated bile salt hydrolase activity. *Molecular Genetics and Genomics*, 239, 269-272.
- Lesk, A. M. (1995). NAD-binding domains of dehydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 775-783.
- Levy, C. C. (1964). Metabolism of coumarin by a microorganism: *o*-coumaric acid as intermediate between coumarin and melilotic acid. *Nature*, 204, 1059-1061.

- Levy, C. C. y Weinstein, G. D. (1964). The metabolism of coumarin by a microorganism. II The reduction of *o*-coumaric acid to melilotic acid *Biochemistry*, 3, 1944-1947.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D. y Hryniewicz, M. (2001). Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization and positive control. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2098-2107
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V. y Dolaro, P. (2001). Antioxidant and radical scavenging properties *in vitro* of polyphenolic extracts from red wine. *European Journal of Nutrition*, 40, 74-77.
- Lönneborg, R. y Brzezinski, P. (2011). Factors that influence the response of the LysR type transcriptional regulators to aromatic compounds. *BMC Biochemistry*, 12, 49.
- Lynd, R. L., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577.

- Ma, B.G., Chena, L., Ji, H.-F., Chen, Z.-H., Yang, F.-R., Wang, L. y Zhang, H.Y. (2008). Characters of very ancient proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 607-611.
- Maddocks, S. E. y Oyston, P. C. F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154, 3609-3623.
- Maga, J. A. (1978). Simple phenol and phenolics compounds in food flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 10, 323-372.
- Maistro, E. L., Angeli, J. P. F., Andrade, S. F. y Mantovani, M. S. (2011). *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. *Genetics and Molecular Research*, 10, 1130-1140.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. y Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15611-15616.

- de Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Marsilio, V., Lanza, B. y Pozzi, N. (1996). Progress in table olive debittering: degradation *in vitro* of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 73, 593–597.
- Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G. y Riva, S. (2011). Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chemical Reviews*, 111, 4111-4140.
- Nishitani, Y. y Osawa, R., (2003). A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 281–284.
- Nishitani, Y., Sasaki, E., Fujisawa, T., Osawa, R., (2004). Genotypic analysis of lactobacilli with a range of tannase activities isolated from human feces and fermented foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 109–117.
- Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S. y Borge, G. I. A. (2012). Antiproliferative effects of fresh and thermal processed green and red cultivars of curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7375-7383.

- Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S. y Shimizu, A., (2000). Isolation of tannin-degrading lactobacilli from human and fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3093-3097.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J. y Ou S. (2016) *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2952-2962
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.
- Piškur , J., Ling, Z., Marcet-Houben, M., Ishchuk, O. P., Aerts, A., LaButti, K. y Phister, T. (2012). The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *Journal of Food Microbiology*, 157, 202-209.
- Pragasam, S. J., Venkatesan, V. y Rasool, M. (2013). Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of *p*-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, 36, 169-176.
- Rao, S. T. y Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 76, 241-250.
- de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A. y Bertrand, A. (2005). Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiology*, 22, 569-575.

- Reverón, I., de las Rivas, B., Muñoz, R. y López de Felipe, F. (2012). Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *Lactobacillus plantarum* exposed to *p*-coumaric acid stress *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 1848-1859
- Reverón, I., Jiménez, N., Curiel, J. A., Peñas, E., López de Felipe, F., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2017). Differential gene expression on *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in response to phenolic compounds unravels new genes involved in tannin degradation *Applied and Environmental Microbiology*, pii: AEM.03387-16.
- de las Rivas, B., Curiel, J. A., Mancheño, J. M. y Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction-and ligation-independent cloning for producing recombinant his-fusion proteins. *Biotechnology Progress*, 23, 680-686.
- de las Rivas, B., Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M. y Muñoz, R. (2009). Molecular screening of wine lactic acid bacteria degrading hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 490-494.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolics acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C. y Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79-90.

- Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2008a). Metabolism of food phenolics acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Food Chemistry*, 107, 1393-1398.
- Rodríguez, H., Landete, J. M., Curiel, J. A., de las Rivas, B., Mancheño, J. M. y Muñoz, R. (2008b). Characterization of the *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3068-3072.
- Rodríguez, H., de las Rivas, B., Gómez-Cordovés, C. y Muñoz, R. (2008c). Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 92-98.
- Salgado, J. M., Rodríguez-Solana, R., Curiel, J. A., de las Rivas, B., Muñoz, R. y Domínguez, J. M. (2012). Production of vinyl derivatives from alkaline hydrolysates of corn cobs by recombinant *Escherichia coli* containing the phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Bioresource Technology*, 117, 274-285.
- Salgado, J. M., Rodríguez-Solana, R., Curiel, J. A., de Las Rivas, B., Muñoz, R. y Domínguez, J. M. (2014). Bioproduction of 4-vinylphenol from corn cob alkaline hydrolyzate in two-phase extractive fermentation using free or immobilized recombinant *E. coli* expressing *pad* gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 58-59, 22-28.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual. Vol 1-3*. (2da. Edición. ed.): Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N.Y., USA.
- Sánchez-Maldonado, A.F., Schieber, A. y Gänzle, M.G. (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1176-1184.
- Saulnier, D. M., Molenaar, D., de Vos, W. M., Gibson, G. R. y Kolida, S. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1753-1765.
- Shahidi, F. y Naczki, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals.*: CRC Press LLC, Boca Raton. Florida, USA.
- Siezen, R. J. y van Hylckama Vlieg, J. E. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10, S3-S15
- Silva, I., Campos, F. M., Hogg, T. y Couto, J. A. (2011). Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 471-475.
- Smid, E.J. y Lacroix, C. (2012). Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 148-154.

- Snowdon, M.E., Bowyer, M.C., Grbin, P.R. y Bowyer, P.K., (2006). Mousy off-flavour: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6465-6474
- Stead, D. (1993) The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 135–141.
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. y Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 185, 60-89.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. y Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-13.
- Ugliano, M, Genovese, A y Moio L. (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5073-5078.
- Valladares, R. B., Graves, C., Wright, K., Gardner, C. L., Lorca, G. L. y González, C. F. (2015). H₂O₂ production rate in *Lactobacillus johnsonii* is modulated via the interplay of a heterodimeric flavin oxidoreductase with a soluble 28 Kd PAS domain containing protein. *Frontiers in Microbiology*, 6, 716

- Vanbeneden, N., Van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F. y Delvaux, F. R. (2008). Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chemistry*, 111, 83-91.
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. y Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiology*, 14, 291-300.
- Wells, J.E., Berry, E.D. y Varel, V.H. (2005). Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Applied and Environment Microbiology*, 71, 7974–7979.
- White, S. A., Peake, S. J., McSweeney, S., Leonard, G., Cotton, N. P. y Jackson, J. B. (2000). The high-resolution structure of the NADP(H)-binding component (dIII) of proton-translocating transhydrogenase from human heart mitochondria. *Structure*, 8, 1-11.
- Whiting, G.C. (1975). Some biochemical and flavor aspects of lactic acid bacteria in ciders and another alcoholic beverages. En: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Whiting, G.C. y Carr, J.G. (Editores). Academic Press. London, UK. p. 69-85.
- Whiting, G.C. y Carr, J.G. (1957). Chlorogenic acid metabolism in cider fermentation. *Nature*, 180, 1479.

- Whiting, G.C. y Carr, J.G. (1959). Metabolism of cinnamic acids and hydroxycinnamic acids by *Lactobacillus pasteurianus* var. *quinicus*. *Nature*, 184, 1427-1428.
- Whiting, G.C. y Coggins, R.A. (1971). The role of quinate and shikimate in the metabolism of lactobacilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37, 33-49.
- Yokotsuka, T. (1986). Soy sauce biochemistry. *Advances in Food Research*, 30, 196-200.
- Zhao, Z. y Moghadasian, M. H. (2010). Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of *in vivo* and *in vitro* studies. *Phytochemistry Reviews*, 9, 133-145.

